

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-80524

(P2005-80524A)

(43) 公開日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int.CI.⁷

C 12 N 15/09
 A 61 K 39/395
 A 61 P 35/00
 C 07 K 7/08
 C 07 K 14/82

F 1

C 12 N	15/00	Z N A A
A 61 K	39/395	D
A 61 P	35/00	N
C 07 K	7/08	
C 07 K	14/82	

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 6 3

4 B 0 6 4

4 C 0 8 5

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 38 O L (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号
 (22) 出願日特願2003-313565 (P2003-313565)
 平成15年9月5日 (2003.9.5)

(71) 出願人

503360115

独立行政法人科学技術振興機構

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人

100097456

弁理士 石川 嵩

(72) 発明者

車 英俊

神奈川県相模原市下溝442番5号 キヤ

スルM3-202

(72) 発明者

額川 菲

神奈川県相模原市陽光台五丁目8番14号

(72) 発明者

前田 忠計

神奈川県相模原市下鶴間五丁目6番1-3

O 5号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】前立腺癌マーカポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、及び該ポリペプチドを利用した前立腺癌の診断方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 前立腺癌マーカポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、及び該ポリペプチドを利用した前立腺癌の診断方法を提供する。

【解決手段】 前立腺由来の特定なアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチド、該前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体、及び前立腺由来の特定なアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することを特徴とする、前立腺癌の診断方法である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチド。

【請求項2】

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上との置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導する変異ポリペプチド。

【請求項3】

下記(1)又は(2)のポリペプチド断片であって、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド断片：

- (1) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチド；
- (2) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド。

【請求項4】

少なくとも15アミノ酸残基を含む、請求項3記載のポリペプチド断片。

【請求項5】

少なくとも20アミノ酸残基を含む、請求項3記載のポリペプチド断片。

【請求項6】

少なくとも25アミノ酸残基を含む、請求項3記載のポリペプチド断片。

【請求項7】

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することを特徴とする、前立腺癌の診断方法。

【請求項8】

被験者から得た検体と、該前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体とを接触させる工程を有する、請求項7記載の診断方法。

【請求項9】

配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することを特徴とする、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断方法。

【請求項10】

被験者から得た検体と、該前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体とを接触させる工程を有する、請求項9記載の診断方法。

【請求項11】

下記(a)、(b)又は(c)を含む、配列番号1～35のいずれか1に記載されたアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対し、特異性を有する抗体製造用組成物：

- (a) 配列番号1～35のいずれか1に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (b) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド；又は
- (c) (a)又は(b)のポリペプチド断片であって、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド断片。

【請求項12】

(c)のポリペプチド断片が、少なくとも15アミノ酸残基を含む、請求項11記載の抗体製造用組成物。

【請求項13】

(c)のポリペプチド断片が、少なくとも20アミノ酸残基を含む、請求項11記載の抗体製造用組成物。

【請求項14】

(c)のポリペプチド断片が、少なくとも25アミノ酸残基を含む、請求項11記載の抗体製造用組成物。

【請求項15】

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体。

【請求項16】

モノクローナル抗体である、請求項15記載の抗体。

【請求項17】

請求項11記載の組成物を哺乳動物に投与することを含む、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を製造する方法。

【請求項18】

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、前立腺癌治療用医薬組成物。

【請求項19】

配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、アンドロゲン非依存性前立腺癌治療用医薬組成物。

【請求項20】

配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、アンドロゲン非依存性前立腺癌形成阻害用医薬組成物。

【請求項21】

配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、前立腺癌診断用キット。

【請求項22】

配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用キット。

【請求項23】

下記(i)、(ii)又は(iii)を含む、前立腺癌診断用核酸プローブ：

(i) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列と、相補的なスクレオチド配列を有するポリスクレオチド；

(ii) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列と、相補的なスクレオチド配列の部分配列を含むスクレオチド断片；又は

(iii) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列を含むポリスクレオチドと、ストリンジメントな条件下でハイブリダイズする、ポリスクレオチド又はスクレオチド断片。

【請求項24】

配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列を含む、ポリスクレオチドの少なくとも1種を検出することを含む、前立腺癌の診断方法。

【請求項25】

被験者から得た検体と、請求項23記載の前立腺癌診断用核酸プローブを接触させることを含む、請求項24記載の診断方法。

【請求項26】

被験者から得た検体に含まれるポリヌクレオチドをポリメラーゼ連鎖反応（P C R）で増幅することを含む、請求項24記載の診断方法。

【請求項27】

配列番号3 6～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる前立腺癌診断用プライマー。

【請求項28】

配列番号3 6～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる、前立腺癌診断用プライマー。

【請求項29】

請求項2 3記載の前立腺癌診断用核酸プローブを含む、前立腺癌診断用キット。

【請求項30】

さらに請求項2 7及び2 8記載の前立腺癌診断用プライマーを含む、請求項2 9記載の前立腺癌診断用キット。

【請求項31】

下記(iv)、(v)又は(vi)を含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用核酸プローブ：

(iv) 配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(v) 配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片；又は

(vi) 配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド又はヌクレオチド断片。

【請求項32】

配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドの少なくとも1種を検出することを含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断方法。

【請求項33】

被験者から得た検体と、請求項3 1記載の核酸プローブを接触させることを含む、請求項3 2記載の診断方法。

【請求項34】

被験者から得た検体に含まれるポリヌクレオチドをポリメラーゼ連鎖反応（P C R）で増幅することを含む、請求項3 2記載の診断方法。

【請求項35】

配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなるアンドロゲン非依存性前立腺癌診断用プライマー。

【請求項36】

配列番号5 3～7 0のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用プライマー。

【請求項37】

請求項3 1記載の前立腺癌診断用核酸プローブを含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用キット。

【請求項38】

さらに請求項3 5及び3 6記載のアンドロゲン非依存性前立腺癌診断用プライマーを含む、請求項3 7記載の前立腺癌診断用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、前立腺癌マーカポリペプチド、該ポリペプチドに対する抗体、及び該ポリペプチドを利用した前立腺癌の診断方法に関するものである。さらに詳細に述べると、アンドロゲン依存性前立腺癌、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌それぞれに特異的なマーカ

ホリペプチド、それらに対する抗体、及び該マーカホリペプチド及び抗体を利用した前立腺癌の診断方法、及び治療用医薬組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、前立腺癌は、米国において男性の罹患率第1位、かつ死亡率第2位の癌で、日本でも高齢化と生活の欧米化の影響でその患者数が急激に増加しているが、前立腺癌は初期症状がないため、転移を伴う進行癌の状態で発見されることが多い。

また現在、前立腺癌の腫瘍マーカとして前立腺特異抗原(Prostatic specific Antigen ; PSA)が広く使われているが、PSAを用いた診断では、偽陽性が多く、良性と悪性との境界領域が広い等の問題があり(特許文献1)、新たな腫瘍マーカが検討されてきた。例えば、前立腺特異性のアンドロゲンで調節された細胞表面セリンプロテアーゼである20PIF2/TMPS2由来する腫瘍マーカ(特許文献1)、ヒト前立腺癌において発現されるC型レクチン膜貫通抗原(特許文献2)、その他、多くの前立腺癌特異的タンパク質の発見に伴う腫瘍マーカ(特許文献3)などである。しかし、これまで確度が高い診断を可能にする前立腺癌マーカは発見、又は実用化されていなかった。

【0003】

さらに、初期の前立腺癌は増殖するために男性ホルモン(アンドロゲン)が必要であり、そのため、アンドロゲン遮断療法が行われる。一方、該前立腺癌はアンドロゲン非依存性を獲得して再増殖を始めるため、通常、該遮断療法の効果は2年以内に失われる。そのため前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると多くの患者は1年以内に死亡するので、前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得しているか否かを判断することは重要であるにも係わらず、アンドロゲン非依存性の獲得を示す前立腺癌マーカは存在せず、アンドロゲン非依存性前立腺癌に対し、ホルモン療法以外の治療法を早期から実施することができなかつた。

【特許文献1】特表2002-517185号公報

【特許文献2】特表2003-507042号公報

【特許文献3】特表2002-520054号公報

【非特許文献1】Chan DW, Sokoll LJ. Prostate-specific antigen: update 1997. J Int Fed Clin Chem 1997; 9: 120-5

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、アンドロゲン依存性前立腺癌マーカホリペプチド、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカホリペプチド、該マーカホリペプチドに特異的な抗体、及び該マーカホリペプチド及び抗体を利用した前立腺癌の診断方法、及び治療用医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、前立腺癌組織からタンパク質を取り出し、アガロース2DE法と液体クロマトグラフィーはタンデム質量分析を組み合わせ、プロテオーム解析により発現タンパク質の解析を行った。その結果、Gene Bank データベースに登録されたタンパク質の中から新たにアンドロゲン依存性前立腺癌、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌のマーカとなるホリペプチドを見出すことができた。本発明は、かかる研究成果に基づきなされたものである。

【0006】

したがって、本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカホリペプチドを提供する。

また、本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカホリペプチドに対する

抗体産生を誘導する変異ポリペプチドを提供する。

【0007】

さらに、本発明は、下記(1)又は(2)のポリペプチド断片であって、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド断片を提供する。

(1) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチド；及び

(2) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチドである。

【0008】

さらに本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することを特徴とする、前立腺癌の診断方法を提供する。

さらに、本発明は、配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することを特徴とする、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断方法を提供する。

さらに、本発明は、下記(a)、(b)又は(c)を含む、配列番号1～35のいずれか1に記載されたアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに対し特異性を有する抗体製造用組成物を提供する。

(a) 配列番号1～35のいずれか1に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド；及び

(c) (a)又は(b)のポリペプチド断片であって、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド断片である。

【0009】

さらに本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を提供する。

さらに本発明は、前記抗体製造用組成物を哺乳動物に投与することを含む、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を製造する方法を提供する。

さらに本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、前立腺癌治療用医薬組成物を提供する。

さらに本発明は、配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、アンドロゲン非依存性前立腺癌治療用医薬組成物、又はアンドロゲン非依存性前立腺癌形成阻害用医薬組成物を提供する。

【0010】

さらに本発明は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、前立腺癌診断用キットを提供する。

さらに本発明は、配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種含有する、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用キットを提供する。

さらに本発明は、下記(i)、(ii)を含む、前立腺癌診断用核酸プローブを提供する。

(i) 配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(ii) 配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片；又は

(iii) 配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド又はヌクレオチド断片である。

【0011】

さらに、本発明は、配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドの少なくとも1種を検出することを含む、前立腺癌の診断方法を提供する。

さらに本発明は、配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる前立腺癌診断用プライマー（フォワードプライマー）、及び配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる、前立腺癌診断用プライマー（リバースプライマー）を提供する。

【0012】

さらに本発明は、前記前立腺癌診断用核酸プローブを含む、前立腺癌診断用キットを提供する。

さらに本発明は、下記(iv)、(v)又は(vi)を含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用核酸プローブを提供する。

(iv) 配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(v) 配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片；又は

(vi) 配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド又はヌクレオチド断片である。

【0013】

さらに本発明は、配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドの少なくとも1種を検出することを含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断方法を提供する。

さらに本発明は、配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなるアンドロゲン非依存性前立腺癌診断用プライマー（フォワードプライマー）、及び配列番号54～70のいずれか1のヌクレオチド配列と、相補的なヌクレオチド配列の部分配列を含むヌクレオチド断片からなる、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用プライマー（リバースプライマー）を提供する。

【0014】

さらに本発明は、前記前立腺癌診断用核酸プローブを含む、アンドロゲン非依存性前立腺癌診断用キットを提供する。

(定義)

本明細書で用いる用語「前立腺癌マーカボリペプチド」とは、ヒト前立腺癌細胞抽出液から抽出され、アガロース二次元電気泳動によりゲル上に展開して得られた、ヒト前立腺癌細胞に特異的なスポットから分離されたボリペプチドをいう。なお、該前立腺癌マーカボリペプチドは、前立腺癌細胞から一般的に発現するボリペプチドであるが、アンドロゲン非依存性を獲得した前立腺癌細胞において特徴的に発現量が変化するものがある。なお、当該前立腺癌マーカボリペプチドは、癌細胞から分離、又は単離された形態のボリペプチドを含むものである。

【0015】

また、本明細書中で用いる用語「血清中抗体」とは、血清中に存在し、配列番号1～35にいずれか1を含むボリペプチドと結合する抗体IgGを意味する。また、本明細書中で

用いる用語「抗体」、及び「標式化抗体」とは、配列番号1～3にいずれか1を含むポリペプチド、その変異ポリペプチド、及びこれらのポリペプチド断片を免疫原として作成されたポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体を意味する。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、新規な、かつ優れた前立腺癌マーカポリペプチド、アンドロゲン非依存性前立腺癌マーカポリペプチド、これら前立腺癌マーカポリペプチドに特異的な抗体、及び該マーカポリペプチド及び抗体を利用した前立腺癌の診断方法、及び治療用医薬組成物を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

(前立腺癌マーカポリペプチドの検索に用いた前立腺癌組織)

本発明の前立腺癌マーカポリペプチド検索に用いる、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞とアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞は、従来知られている方法で作成することができる

(1)。例えば、アンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞として、市販されているLNCaP細胞株(American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA)を用いることができる。該LNCaP細胞株は、ウシ胎仔血清10%を含有する培養培地(例えは、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium)中で維持、培養した後、該培養LNCaP細胞1x10⁷個を0.1 ml マトリグレル(Matrigel, Becton Dickinson Labware, NJ, USA)に混入して、雄ヌードマウス(BALB/c strain)の皮下に接種し、腫瘍が100から200 mm³になったところで、精巢を摘除する。該腫瘍は一次的に縮小するが、まもなく再増殖を始める。このときの精巢摘除前の腫瘍をアンドロゲン依存性前立腺癌、精巢摘除後に再増殖した腫瘍をアンドロゲン非依存性前立腺癌として用いることができる。

【0018】

(ヒト正常前立腺組織とヒト前立腺癌組織の採取)

本発明で用いたヒト正常前立腺組織と前立腺癌組織は、手術を施した患者の摘除検体から採取した。主として、神奈川県相模原市にある北里大学病院泌尿器科で手術を受けた患者から同意を得て採取されたものである。該正常前立腺組織は、例えは、膀胱癌治療のために膀胱全摘除術が行われたときに同時に合併切除される前立腺から採取されたものである。また、前立腺肥大症により前立腺切除術が実施されたときに非癌前立腺組織も採取した。さらにはヒト前立腺組織は、前立腺癌治療のために前立腺全摘除術もしくは前立腺切除術が行われたときに摘除される前立腺、或いは、前立腺癌診断の際に実施される前立腺生検術のときに採取されたものである。このとき、事前に男性ホルモン遮断療法が施されていて、前立腺癌が再増殖を始めた症例の前立腺癌をアンドロゲン非依存性前立腺癌とした。

【0019】

(前立腺癌マーカポリペプチドの検索)

前記検索用の前立腺癌組織から得た細胞抽出物に含まれるポリペプチドを、常法であるアガロース二次元電気泳動法によりゲル上に展開した(2)。すなわち、タンパク質の混合液をまず各タンパク質が保有する電荷(等電点)で分離し(一次元目)、続いて分子量で分離する(二次元目)手法である。最も一般的な方法は固定化pH勾配二次元電気泳動法(イモビライジング2DE)であり、例えは、アマシャムバイオサイエンス(株)から販売されているキットを用いて実施することができる。

【0020】

この方法は、あらかじめpH勾配が固定化されたポリアクリラミドゲルを一次元目に用い、続いてSDSポリアクリラミドゲルで分子量によってタンパク質を分離する手法であるが、一次元目にアクリラミドゲルを用いるため、高分子量タンパク質が分離できないという欠点がある(3)。

【0021】

本発明者らが用いたアガロース二次元電気泳動法は、一次元目にアガロースゲルを用い

ることでこの欠点を克服したものである。典型的な該アガロース二次元電気泳動法の手法を説明する。まず、アガロース1%、D-ソルビトール1.2%、5M尿素、1Mチオ尿素、及び両性担体（例えば、ファルマライト、アマシャムバイオサイエンス（株））を混合し、直径3.4 mm、長さ180 mmのガラス管に注入して1次元目のゲルを作成する。この一端にタンパク質混合液、細胞抽出液、組織抽出液、又は血清などのサンプルを注入し、50.0～100.0ボルトの電圧をかけることにより電気勾配を作り、等電点電気泳動を行なう。二次元目は5～20%の濃度に調製したSDS-ポリアクリルアミドゲルを作成し、電気泳動をかける（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS-PAGE）。所望の時間、電気泳動した後、二次元電気泳動ゲルをクーマジー染色、銀染色、シプロリビー染色などで染色して可視化する。このようにして、サンプルに含まれるポリペプチドをゲル上のスポットとして得ることができる。

【0022】

（ゲル上のポリペプチド（タンパク質）の同定）

該ポリペプチドの同定は、プロテオーム解析により行なうことができる。すなわち、アガロース二次元電気泳動法に、自動ライ化された液体クロマトグラム-タンデム質量分析法（LC/MS/MS）を組み合わせた公知の方法で実施できる（4）。すなわち、まず、ゲルのタンパク質スポットをトリプシンなどでゲル内消化することでペプチドに分解する。様々な部位で切断された、色々な長さの各ペプチド断片をLC/MS/MSで測定すると、ペプチドの正確な質量が質量プロダクトイオン、又はマスクタグとして得ることができる。このマスクタグの質量スペクトルのデータを使って、ゲノム解析で作製されたデータベースを検索し、ポリペプチドを同定することができる。本発明者らは、該ペプチド断片の質量スペクトルデータを、解析ソフトウェア（SEQUEST）を用いて解析し、米国NCBIのデータベースを用いて同定した。

【0023】

（二次元電気泳動ゲルの定量的スポット解析）

二次元電気泳動ゲルの乾燥後、該ゲルの像を画像ファイルとしてコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェア（例えば、Phoretix 2D Advanced Version 5.01（Nonlinear Dynamics Ltd, UK））を用いて、各タンパク質スポット毎に定量した。また、同様の画像解析ソフトウェアによって、各ゲルのタンパク質スポットの適合、解析ができるので、ここからT検定などの統計学的手法を用いて、対照群別の比較検討を行った。

【0024】

（前立腺癌マーカポリペプチド）

このような二次元電気泳動ゲルと、プロテオーム解析により、本発明では、配列番号1～3のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドを得ることができた。これらのポリペプチドは、それぞれ特定の機能、又は発現する器臓などが知られていたが、本発明者らが見出すまで、前立腺癌との関係は全く知られていなかった。したがって、本発明者らは、これらのポリペプチドが前立腺癌マーカとして利用できることを初めて見出したのである。

【0025】

本発明の前立腺癌マーカポリペプチドを、従来知られていた名称などで列記する。なお、それぞれのマーカポリペプチドに付された番号は、本明細書に添付された配列表のアミノ酸配列番号と一致している。なお、該前立腺癌マーカの具体的な同定手順は、本明細書の実施例1～3に具体的に記載されている。

【0026】

1. KIAA0336 遺伝子産物 (KIAA0336 gene product)
2. TAR RNA-相互作用タンパク質 (TRIP, TAR RNA-interacting protein, TRIP)
3. RAD50 ホモログ (RAD50 homolog)
4. 仮想タンパク質 FLJ10839 (Hypothetical protein FLJ10839)
5. 富ロイシンPPI-モチーフ包含 (Leucine-rich PPI-motif containing)
6. RNA ヘリカーゼ KIAA0801 (RNA helicase KIAA0801)

7. ユビキチン特異性プロテアーゼ 7 (Ubiquitin specific protease 7)

8. カルシウム(ca2+)恒常性内部原形質網状質タンパク質
(Calcium (ca2+) homeostasis endoplasmic reticulum protein)

【0027】

9. 関連ヌクレオポリン133kDa、又はMGC21133タンパク質
(Nucleoporin 133kDa, Protein for MGC21133)

10. RNA ヘリカーゼ関連タンパク質 (RNA helicase-related protein)

11. MDP-4 (MDP-4)

12. インスリン滅成酵素 (Insulin-degrading enzyme)

13. MCM5 ミニクロモソーム維持欠陥5、細胞分裂サイクル46

(MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cy-
cle 46 (S. cerevisiae))

14. 電圧依存性アニオン選択チャンネルタンパク質 1、又はVDAC 1

(Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1))

【0028】

15. プロヒビチン (Prohibitin)

16. NipSnap1タンパク質 (NipSnap1 protein)

17. ペロキシレドキシン 4 (Peroxiredoxin 4)

18. スプライシングコアクチベータサブユニットSRm300

(Splicing coactivator subunit SRm300)

19. ロンプロテアーゼホモログ (Lon protease homolog)

20. ピュロマイシン感受性アミノペプチダーゼ

(Puromycin-sensitive aminopeptidase)

【0029】

21. EBNA-2 コアクチベータ (100kD) (EBNA-2 co-activator (100kD))

22. JKTBP1

23. GTP-結合性タンパク質ベータ鎖ホモログ

(GTP-binding protein beta chain homolog)

24. 核・塩素イオンチャンネルタンパク質

(Nuclear chloride ion channel protein)

25. ウィリアム・ベウレン症候群染色体領域1ホモログ

(William-Beuren syndrome chromosome region 1 homolog)

26. 抗酸化性タンパク質 2 (Antioxidant protein 2)

【0030】

27. ペルオキシレドクシン 1 (Peroxiredoxin 1)

28. コフィリン 1 (Cofilin 1)

29. クルッペルタイプ亜鉛フィンガータンパク質、もしくは、PEG3

(Kruppel-type zinc finger protein, PEG3)

30. スカフフォルドアタッチメント因子B、又はHSP27 ERE-TATA-結合性タンパク質

(Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein)

31. スプライソゾーム関連タンパク質130 (Spliceosome-associated protein 130)

32. T 細胞により認識される扁平上皮癌抗原3、又はSART3

(Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3, SA-
RT3)

33. ユビキチン活性化酵素 E1 (Ubiquitin-activating enzyme E1)

34. カリオフェリン(インポルテン)ベータ1 (Karyopherin (importin) beta 1)

【0031】

35. ha1225 遺伝子産物 (The ha1225 gene product)

これら前立腺癌マーカポリペプチドを、アンドロゲン依存性前立腺癌の群とアンドロゲン非依存性前立腺癌の群とで発現を統計学的に比較検討したところ、p<0.1において非依

存群で増加したマーカポリペプチドが12個、減少したマーカポリペプチドが6個認められた。すなわち、前記前立腺癌マーカポリペプチドのうち、特にアンドロゲン非依存性前立腺癌に特異的なマーカが見出された。該アンドロゲン非依存性前立腺癌のマーカポリペプチドは次のとおりである。

【0032】

(アンドロゲン非依存性を獲得した後、発現量が増加するマーカポリペプチド)

1 8. スプライシングコアクチベータサブユニットSRm300

1 9. ロンプロテアーゼホモログ

2 0. ピュロマイシン感受性アミノペプチダーゼ

2 1. EBNA-2 コアクチベータ (100kD)

2 2. JKTBP1

2 3. GTP-結合性タンパク質ベータ鎖ホモログ

2 4. 核・塩基イオンチャンネルタンパク質

2 5. ウィリアムーベウレン症候群染色体領域1ホモログ

2 6. 抗酸化性タンパク質

2 7. ペルオキシレドクシン 1

2 8. コフィリン 1

(アンドロゲン非依存性を獲得した後、発現量が減少するマーカポリペプチド)

【0033】

2 9. クルッペルタイフ亜鉛フィンガータンパク質

3 0. スカファルルドアッターメント因子B、又はHSP27 ERE-TATA-結合性タンパク質

3 1. スプライソzyme関連タンパク質130

3 2. T 細胞により認識される扁平上皮癌抗原3

3 3. エビキチン活性化酵素 EI

3 4. カリオフェリン(インボルチン)ベータ1

3 5. ha1225 遺伝子産物

【0034】

したがって、抗体などを用いた検査により、被検者の血液中などに、前記1～35の前立腺癌マーカポリペプチドが見出された場合、該被験者を前立腺癌患者、又は前立腺癌ハイリスク者と判定することができる。また、被験者に、前記18～28の前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種の増加、及び／又は29～35の前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種の減少が観察される場合、該被験者はアンドロゲン非依存性前立腺癌を有するか、又はそのハイリスク者と判定することができる。

【0035】

したがって、被験者から得た検体と、該前立腺癌マーカポリペプチドを検出することにより、前立腺癌を診断することができる。さらに、被験者から得た検体から、配列番号1～3～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドの少なくとも1種を検出することにより、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断を行なうことができる。該前立腺癌マーカポリペプチドの検出は、被験者から得た検体と、該前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体とを接触させることにより行なうことができる。

【0036】

本発明で用いる抗体は、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに特異性を有する抗体である。該抗体は、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。

本発明の抗体を用いる免疫検定(測定)法を挙げると、酵素免疫測定法(EIA)、酵素イムノメトリックアッセイ法(ELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、放射線免疫測定法(RIA)、発光免疫測定法、イムノプロット法、エクススタンプロット法、免疫染色法などがある。

ウエスタンプロット法は、生体試料中に存在する当該タンパク質の分子量を知るために有効である。この方法は、例えば、臓器組織由来の粗抽出液などの生体試料液をアクリルアミドゲル電気泳動させた後、メンブランに転写し、当該タンパク質、又は当該ペプチド

を認識する抗体と反応させ、生成する免疫複合体を標識第二抗体を用いて検出するものである。この方法では、該免疫複合体と結合する標識第二抗体の標識量を測定する。

【0037】

免疫染色法は、組織、及び細胞における対象ポリペプチドの発現部位を解析するため有効である。この方法は、例えば、スライドガラス上に固定された組織切片、細胞などを、本発明の抗体と反応させ、生成する免疫複合体を標識第二抗体を用いて検出することにより実施する。この方法では、該免疫複合体と結合した標識第二抗体の標識量を測定する。

【0038】

前記前立腺癌マーカポリペプチドを認識する抗体を用いる免疫検定の好ましい例として、ELISA法を挙げることができる。このELISA法は、一般的な競合法、サンドイッチ法などの手法に従って実施でき、更に液相系でも、固相系でも実施できる。

ELISA法の好ましい実施態様は次のとおりである。まず、標準抗原(例えば、精製した当該ペプチド)を適当な担体に固定化し、ブロッキングする。次いで、検出が望まれるマーカペプチドを含有するサンプル、及び当該抗体を、上記固定化標識抗原と接触させて、抗体-免疫複合体、及び抗体-標準抗原免疫複合体を競合的に生成させる。生成した抗体-免疫複合体の量を測定し、予め作製した検量線からサンプル中の、又は当該ポリペプチドの質量を決定することができる。

【0039】

本発明の抗体と標準抗原との反応性が予め判っており、検量線などが作成できる場合には、前記固定化標準抗原の代わりに、当該ポリペプチドを含有するサンプルを固定化して用いることもできる。

上記ELISA法の実施態様においては、当該抗体を第一抗体として用い、この第一抗体に対する第二抗体を標識して用いることもできる。この場合は抗体-免疫複合体の量は、これに結合した標識第二抗体の標識量を測定することにより容易に求めることができる。上記方法の変法として、標識した第二抗体を用いることなく、第一抗体を、例えば酵素で標識して利用することもできる。更に、第一抗体をビオチンで標識し、第二抗体の代わりにアビシン、又はストレプトアビシンに酵素を結合させたものを用いてもよい。

【0040】

(本発明の抗体の調製)

本発明で用いる抗体は、本発明の前立腺癌マーカポリペプチドを認識し、抗原抗体反応するものであれば、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明の抗体の製造に用いる抗原となる、ポリペプチド、ペプチド又はその断片には下記のものがある：

- (1) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチド；
- (2) 配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列から、アミノ酸残基1以上の置換、欠失、付加及び／又は挿入によって変異したアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導する変異ポリペプチド；及び
- (3) 前記(1)又は(2)のポリペプチド断片であって、かつ配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導するポリペプチド断片である。

【0041】

なお、該ポリペプチド断片は、前立腺癌マーカポリペプチドに対する抗体産生を誘導することができれば、特にその長さに制限はないが、通常、少なくとも15アミノ酸残基、好ましくは、少なくとも20アミノ酸残基、特に好ましくは、少なくとも25アミノ酸残基を含むものである。なお、これらの(1)又は(2)のポリペプチド、又は(3)そのペプチド断片を、抗体誘導に好ましい成分と組み合わせて、抗体製造用組成物として用いることができる。本発明で用いる抗体を下記の方法で調製することができる。

【0042】

(モノクローナル抗体の調製)

まず、モノクローナル抗体產生細胞を次のように作成することができる。本発明の前記(1)又は(2)のポリペプチド、又は(3)そのペプチド断片を、単独で、又は担体、希釈剤などと組み合わせて温血動物に投与する。投与に際して抗体产生能を高めるため、完全プロイントアジュバントや不完全プロイントアジュバントを投与してもよい。該投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なう。投与する温血動物の例を挙げると、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあり、特にマウス、及びラットが好ましい。

【0043】

モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓、又はリンパ節を採取する。そして、採取された組織に含まれる抗体產生細胞を同種、又は異種動物の骨髓細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマを調製することができる。

【0044】

抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後述する標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタイルの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495、(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤の例を挙げると、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどがあり、特にPEGが好ましい。

【0045】

該骨髓細胞の例を挙げると、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓細胞があり、特にP3U1が好ましい。

融合時における抗体產生細胞(脾臓細胞)数と骨髓細胞数との好ましい比率は、1：1～20：1程度である。細胞融合は、PEG、好ましくはPEG1000～PEG6000を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率良く実施できる。

【0046】

得られたモノクローナル抗体產生ハイブリドーマのスクリーニングは種々の方法で行なうことができる。例えば、前立腺癌マーカポリペプチドの抗原を直接、又は担体とともに吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)に、ハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いた細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる。)、又はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法；抗免疫グロブリン抗体、又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したマーカポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などを挙げられる。

【0047】

モノクローナル抗体の選別は、常法に従って行なうことができる。通常、HAT(ヒボキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。また、選別、及び育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、牛胎児血清1～20%、好ましくは10～20%含むRPMI-1640培地、牛胎児血清1～10%を含むGIT培地(和光純業工業(株))、又はハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。

【0048】

培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常、炭酸ガス5%の温潤環境下で行なう。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にし

て測定できる。

【0049】

モノクローナル抗体の分離、精製は、常法に従って行なうことができる。例えば、通常、免疫グロブリンの分離、精製に利用される、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相による方法、並びにプロテインA又はプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法などである。

【0050】

（ポリクローナル抗体の調製）

本発明のポリクローナル抗体は、常法に従って製造することができる。例えば、免疫原自体、又はその抗原性ペプチド断片とキャリアタンパク質との複合体をつくり、前記モノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

【0051】

温血動物の免疫に用いる免疫複合体を調製する場合、キャリアタンパク質の種類、及び該キャリアタンパク質とハブテンとの混合比は、キャリアタンパク質に架橋せたハブテンに対して抗体が効率よく產生されれば、特に制限されない。例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又はヘモシアンをキャリアタンパク質として用いた場合、これらを重量比でハブテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合で架橋させるのが好ましい。

【0052】

また、ハブテンとキャリアタンパク質のカップリングには、種々の縮合剤を用いることができる。該縮合剤の例を挙げると、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイimid活性エスチル、チオール基、ジオキビリジル基を含有する活性エスチル試薬等がある。該縮合生成物を、温血動物に対して、抗体產生が可能な部位にそれ自体、又は担体、希釈剤とともに投与する。

【0053】

投与に際して抗体產生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なう。ポリクローナル抗体は、前記方法で免疫された温血動物の血液、腹水などから採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体値の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして行なうことができる。また、ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離、精製法により行なうことができる。

【0054】

本発明のガン診断用キットは、このようにして得られたポリクローナル、又はモノクローナル抗体を含むものである。該ガン診断用キットは、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む、前立腺癌マーカボリベプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種利用することで、前立腺癌の診断に使用することができる。また、該ガン診断用キットは、配列番号18～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリベプチドに特異性を有する抗体を、少なくとも1種を利用することにより、アンドロゲン非依存性前立腺癌を診断することができる。

【0055】

なお、該診断用キットは、必要に応じて、免疫反応用ウェル、染色剤、検出用の酵素標識抗体、洗浄液、抗体希釈液、液体希釈液、酵素基質液、酵素基質液希釈液、その他の試薬を含むものである。

また、配列番号1～35のいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリベプチドに特異性を有する抗体は、前立腺癌特異的タンパク質の発現を抑制するものであるから、ガン化の予防、進行遅延、及び治療に使用することができる。特に、配列番号18～3

らのいずれか1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカホリペプチドに特異性を有する抗体は、前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得を阻害し、アンドロゲン非依存性前立腺癌の進行遅延、及び治療に使用することができる。

【0056】

本発明の前記前立腺癌マーカホリペプチドに対する抗体を含む医薬組成物は、経口的に、又は非経口的に投与することができ、さらに該非経口的投与は、組織への局所的な投与を含む。

本発明の医薬組成物を経口投与する場合、汎用されている担体などの製剤用成分、例えば、充填剤、增量剤、結合剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、緩衝剤、等強化剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、コーティング剤、界面活性剤、吸収促進剤、保湿剤、温潤剤、吸着剤、滑沢剤及び賦形剤などを用いることができる。また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などの添加剤を用いてもよい。

【0057】

製薬用成分の具体的な例を挙げると、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸などの賦形剤、水、エタノール、単シリコブ、ブドウ糖液、デンパン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラツク、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ホリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖などの崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩等の滑沢剤などである。さらに必要な方に応じて、上記の各割剤について公知のドラッグデリバリーシステムの技術を採用し徐放化、局所適用化（トローチ、パックル剤、舌下錠等）、薬物放出制御、鴨溶化性、胃溶化性などを施すことができる。

【0058】

また、本発明の医薬組成物を非経口投与の場合、点滴、静脈注射、皮下注射、筋肉注射などの注射による投与、油脂坐剤、水溶性坐剤、座剤による直腸投与などの形態とすることができる。該調剤は、製薬分野における通常の担体を用い、常法により容易に行なうことができる。

本発明の抗体を含む医薬組成物は、例えば、ヒト、その他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イス、サルなど）に対して投与することができる。該抗体の投与量は、対象の状態、投与ルートなどにより適宜変わるが、例えば、注射剤の形態で体重6.0kgの成人患者に投与する場合は、一日につき約5.0～5.00mg程度、好ましくは約1.00～2.50mg程度、より好ましくは約1.2～2.00mg程度を静脈から投与するのが好ましい。

【0059】

また、本発明の前立腺癌マーカホリペプチドをコードするポリヌクレオチド、すなわち、配列番号36～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドの少なくとも1種を検出することにより、被験者が前立腺癌を有するか、又はそのハイリスク者であるか否かを判定することができる。特に、配列番号53～70のいずれか1のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドの少なくとも1種を検出することにより、被験者がアンドロゲン非依存性前立腺癌を有するか、又はそのハイリスク者であるか否かを判定することができる。

【0060】

本発明の前立腺癌マーカホリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出する、前立腺癌の診断方法では、被験者から得た検体、例えば、血液、細胞抽出液、生検試料などに含まれるポリヌクレオチドを検出する。

該ポリヌクレオチドの検出は、本発明の前立腺癌マーカホリペプチドをコードするポリ

スクレオチドを、その部分配列を有する合成DNAプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって増幅するか、又は適当なベクターに組み込んだポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの一部、又は全領域をコードするポリヌクレオチド、又は合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって行なうことができる。該ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(5)に記載の方法などで行なうことができる。該ハイブリダイゼーションは、ハイストリンジェントな条件、例えば、ナトリウム濃度が約1.9～4.0 mM、特に約1.9～2.0 mMで、温度が約5.0～7.0°C、特に約6.0～6.5°Cの条件で行なうのが好ましい。また、ナトリウム濃度が約1.9 mMで温度が約6.5°Cの場合が最も好ましい。

【0061】

本発明では、下記(i)、(ii)又は(iii)を含む、前立腺癌診断用核酸プローブを用いることができる。

- (i) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列と、相補的なスクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；
- (ii) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列と、相補的なスクレオチド配列の部分配列を含むスクレオチド断片；又は
- (iii) 配列番号36～70のいずれか1のスクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド又はスクレオチド断片である。

【0062】

特に、配列番号53～70のいずれか1のスクレオチド配列と相補的なスクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、アンドロゲン非依存性癌診断用核酸プローブとして用いることができる。

また、本発明の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、PCR法によって検出する場合、常法で行なうことができる。

該PCR法では、配列番号36～70のいずれか1種のスクレオチド配列に対するセンス鎖断片をフォワードプライマーとして、アンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして用いる。

特に、配列番号53～70のいずれか1のスクレオチド配列の部分配列を含むスクレオチド断片からなるプライマー（フォワードプライマー）、及び配列番号53～70のいずれか1のスクレオチド配列と、相補的なスクレオチド配列の部分配列を含むスクレオチド断片からなるプライマー（リバースプライマー）を用いることにより、アンドロゲン非依存性前立腺癌の診断を行なうことができる。

【0063】

なお、該フォワードプライマーの長さは、特に制限する必要はないが、通常14～60 bpであり、かつリバースプライマーの長さも特に制限する必要はないが、通常14～60 bpとするのが好ましい。

本発明の前立腺癌診断用キットは、本発明の前立腺癌マーカポリペプチドをハイブリダイゼーションによって検出する場合、配列番号36～70のいずれか1のポリペプチド配列の一部、又は全領域をコードするポリヌクレオチド、又は合成DNAを用いて標識したものを、前立腺癌診断用核酸プローブとして含む。

【0064】

また、該前立腺癌診断用キットが、アンドロゲン非依存性前立腺癌の検出を目的とし、該前立腺癌マーカポリペプチドをハイブリダイゼーションによって検出する場合、配列番号53～70のいずれか1のポリペプチド配列の一部、又は全領域をコードするポリヌクレオチド、又は合成DNAを用いて標識したものを、前立腺癌診断用核酸プローブとして含む。

【0065】

本発明の前立腺癌診断用キットは、本発明の前立腺癌マーカポリペプチドをPCR法によって検出する場合、配列番号36～70のいずれか1種のスクレオチド配列に対するセ

ンス鎖断片をフォワードプライマーとして、アンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして含む。また、本発明の前立腺癌診断用キットが、アンドロゲン非依存性前立腺癌の検出を目的とし、前立腺癌マーカボリペプチドをPCR法によって検出する場合、配列番号53～70のいずれか1種のスクレオチド配列に対するセンス鎖断片をフォワードプライマーとして、アンチセンス鎖断片をリバースプライマーとして含むものである。

【0066】

本発明の前立腺癌マーカボリペプチドは、そのコードされているポリヌクレオチドである、配列番号36～70のスクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込み、かつ該発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、該宿主を増殖させることにより製造することができる。

【0067】

本発明の前立腺癌マーカボリペプチドの発現ベクターは、該ボリペプチドをコードするポリヌクレオチドから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当なベクター中のプロモーターの下流に連結することで製造することができる。

ここで用いるベクターには、大腸菌由来のラムシド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のラムシド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来ラムシド(例、pSH19, pSH15)、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV、p cDNA I/Neoなどがある。

【0068】

本発明で用いるプロモーターは、使用する宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがある。該宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、lPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどがあり、該宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、該宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどがあり、さらに該宿主が昆虫細胞である場合は、オリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどである。

【0069】

本発明の発現ベクターには、さらに所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ボリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを含むものを用いることができる。該選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などがある。また、必要に応じて、宿主に適したシグナル配列を、本発明のボリペプチドのN端末側に付加する。該宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが、該宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼシグナル配列、サブチリシングシグナル配列などが、該宿主が酵母である場合は、MF αシグナル配列、SUC2・シグナル配列などが、該宿主が動物細胞である場合には、インシュリニシグナル配列、α-インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを利用できる。このように構築した本発明のボリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0070】

本発明で用いる宿主には、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、及び動物細胞などがある。該バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 1-6巻、1,11(1979)などに記載の方法がある。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻、18-2-187(1991)、プロセーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ

・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などの方法がある。昆虫細胞又は昆虫形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法がある。また、動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ウイロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法がある。このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を作製することができる。

【0071】

該宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他の組合せが含まれている。ここで炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブリカーペートン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液など、また無機栄養分としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどである。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0072】

エシエリヒア属菌を培養する培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラ・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。

また、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43°Cで約3~24時間行ない、必要により、通気や搅拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40°Cで約6~24時間行ない、必要により通気や搅拌を加えることもできる。

【0073】

宿主が酵母である形質転換体を培養する培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] がある。該培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20°C~35°Cで約24~72時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0074】

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する場合、グレイスインセクト培地 (Grace's Insect Medium; Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を加えた倍地などを用いる。該培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27°Cで約3~5日間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0075】

また、宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むME M培地 (サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)), DME M培地 (ウイロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)), 199培地 (プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイ

オロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)などを用いる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30°C~40°Cで約15~60時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。このようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜又は細胞外に本発明のポリペプチドを產生させることができる。

【0076】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、常法に従う。例えば、本発明のポリペプチドを培養菌体、細胞から抽出するに際して、培養後、公知の方法で菌体又は細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び/又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などである。該緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの変性剤や、トリトンX-100OTMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体又は細胞と上清とを分離し、上清を集め。このようにして得られた培養上清、又は抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なう。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、臍外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などがある。

【0077】

該ポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、粗撰え体が產生するポリペプチドを、精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどがある。このようにして生成した本発明のポリペプチドは、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

【実施例】

【0078】

前立腺癌細胞株からのポリペプチド試料の抽出

American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)から入手した、ヒト前立腺癌細胞LNCaPを前立腺癌マーカポリペプチドを検索するサンプリングとして使用した。LNCaP細胞を、ウシ胎仔血清10%を含有するRPMI倍液(Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI)中で、 0.5 mm^2 湿度環境下、37°Cで培養した。また、本実施例では、LNCaP細胞を日本SLC(静岡、日本)から購入したオスヌードマウス (BALB/c strain)に移植した。

【0079】

まず、LNCaP細胞 1×10^7 個をマトリゲル0.1 ml (Matrigel: Becton Dickinson Labware, NJ, USA)に混入し、該混合物を雄ヌードマウスの背部皮下に移植した。癌組織が 100 から 200 mm^3 になったところで、精巢を摘除した。癌組織は一次的に縮小したが、まもなく再増殖を始めた。該癌が 200 から 400 mm^3 に達したところで摘出した。精巢摘除前に採取した癌をアンドロゲン依存性 (Androgen Dependent; AD)、精巢摘除後に再増殖した癌をアンドロゲン非依存性 (Androgen Independent; AI) とした。

【実施例】

【0080】

癌マーカポリペプチド分布マップの作製

実施例1で得た癌細胞を 20 倍重量のタンパク抽出液でホモジナイズし、超遠心した

後、得られた上清をプロテオーム解析に使用した。本発明者らは、該プロテオーム解析をアガロース二次元電気泳動法にタンデム質量分析法(MS/MS)を組み合わせて実施した。

【0081】

アガロース二次元電気泳動法は、一次元目の等電点電気泳動にアガロースを適用した公知の方法によって行った(2)。すなわち、前記抽出液100μl(タンパク質1mgに相当)を直径3.4 mm、長さ180 mmのアガロースグルーランドに置き、700 vの電荷を20時間かけた。その後、このゲルを195×120 mmのSDS-PAGE ゲル(12%均一ゲルと6-10%濃度勾配ゲル)の上に置き、SDSサンプルバッファー(SDS2%、グリセロール10%、2-メルカブトエタノール5%、プロモフェニルブルー0.02%、0.05Mトリス-HCl, pH 6.5)を上部から流して、60 mAで泳動した。泳動終了後、ゲルをクマジーブリリアントブルーR-350 (Coomassie Brilliant Blue R-350)で染色した。

【0082】

前立腺癌のアガロース二次元電気泳動ゲル上の合計324個のタンパク質スポットの同定を進め、ゲル間で重複しているスポットを除いて303個のスポットに番号をつけて二次元電気泳動ゲルマップを作成した。高分子タンパク質領域に重点をおいた6-10%濃度勾配ゲルから108個(図1)、中低分子タンパク質領域に重点を置いた12%均一ゲルから195個(図2)のスポットに番号を付した。その後、これらスポットから、合計233個のタンパク質を同定することができた。

【0083】

なお、図1及び2は、実施例1のアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞に由来する、癌マーカボリペプチドの分布を示すマップである。また、得られた二次元電気泳動ゲルは乾燥後、画像ファイルとしてコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェア(Phoretix 2D Advanced Version 5.01 : Nonlinear Dynamics Ltd, UK)を用いてタンパク質スポットの定量解析を行った。

【実施例】

【0084】

実施例2で得られた二次元電気泳動ゲルのスポットを、公知の液体クロマトグラム-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)によって同定した。すなわち、ゲル上のスポットを切り出し、タンパク質をトリプシンでゲル内消化したのちに約1.5 pmolに相当する量をLC-MS/MSにかけた。ここから得られたペプチド断片の質量情報を解析ソフトウェア(SEQUENT)を用いて解析し、米国NCBIのデータベースにより前記ゲル上のスポットに含まれるタンパク質を同定した。タンパク質のアミノ酸配列と塩基配列もNCBIデータベースによった。なお、2003年9月1日現在、下記URLでプロテオーム解析ソフトウェア(SEQUENT)を入手することができる。

【0085】

URL: <http://fields.scripps.edu/sequent/index.html>

またNCBIデータベースのURLは次のとおりである。

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

前記NCBIデータベースで同定した全タンパク質233個をMedlineを用いて検索したところ、これまで前立腺癌との関連性が報告されていないタンパク質35個が含まれており、すなわち、新たな前立腺癌マーカボリペプチドが見出された。

【0086】

ここで同定されたタンパク質は、本明細書の実施の態様の項に列举されている。それぞれのタンパク質に付された番号は、本明細書に添付された配列表のアミノ酸配列番号と一致している。

【実施例】

【0087】

アンドロゲン非依存性前立腺癌マーカボリペプチドの選別

二次元電気泳動ゲルは乾燥後に画像ファイルとしてコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアPhoretix 2D Advanced Version 5.01 (Nonlinear Dynamics Ltd, U

K)を用いてタンパク質スポットの定量解析を行った。アンドロゲン依存群5検体と非依存群5検体の二次元電気泳動ゲルのタンパク質スポットを個別にPhoretix 2D Advanced Version 5.01で定量比較し、2群間に於ける各スポットの発現量をT検定によって統計学的に検定した。

【0088】

アンドロゲン依存群と非依存群とでタンパク質の発現を統計学的に比較検討したところ、実施例3で見出された前立腺癌マーカポリペプチドのうち、 $p < 0.1$ において非依存群で増加したタンパク質が12個、減少したタンパク質が6個認められた。同様に、 $p < 0.05$ では、増加したタンパク質が7個、減少したタンパク質が4個認められた。

【0089】

図3に、前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得に伴い統計学的有意差($p < 0.05$)をもって量的増減を示したタンパク質スポットと、その定量比較グラフを示した。図3において、ADはアンドロゲン依存群を、AIはアンドロゲン非依存群をPNは、図1及び2におけるタンパク質スポット特定番号(Protein-identification number)を示す。なお、該PNは実施例で用いるタンパク質スポットの固有番号であり、本明細書の配列表の配列番号とは一致していない。

【0090】

また、肉眼的に各群のゲルで増減のみられたポリペプチドも含めて文献的に検討したところ、従来、前立腺癌との関連が報告されているものは17個あった(図3)。これらは、配列表に記載されている配列番号18～36のアミノ酸配列を含む、ポリペプチドである。これらポリペプチドの電気泳動像を解析の結果、配列番号18～28のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得した場合に発現量が増加し、配列番号29～36のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、発現量が減少することが明らかになった。

【実施例】

【0091】

ヒト前立腺癌における前立腺癌マーカポリペプチドの発現

ヒト前立腺癌における、前記前立腺癌マーカポリペプチドの発現を、抗体を用いたウエスタンプロットにより確認した。

(ヒト前立腺癌サンプルの調製)

本実施例で用いたヒトの前立腺癌組織、及び正常前立腺組織は、神奈川県相模原市にある北里大学病院泌尿器科で手術を受けた患者から同意を得て採取した。患者の詳細は以下のとおりである。

【0092】

1. N P 1：正常前立腺組織：51歳男性、膀胱癌にて合併摘除された前立腺から正常前立腺組織を採取した。

2. P 8：正常前立腺組織：70歳男性、前立腺癌にて前立腺全摘除術を施行された。非癌部位から正常前立腺組織を採取した。

3. P 3：正常前立腺組織：60歳男性、膀胱癌にて合併摘除された前立腺から正常前立腺組織を採取した。

4. P 5：前立腺癌組織(アンドロゲン依存性)：50歳男性、前立腺癌にて前立腺全摘除術を施行された。肉眼的に癌部位から前立腺癌組織を採取した。

5. P 1：前立腺癌組織(アンドロゲン非依存性)：80歳男性、前立腺癌にてアンドロゲン除去療法を試行後に再発し、尿閉となったため、経尿道的前立腺切除術が施行された。切除組織はアンドロゲン非依存性前立腺癌であり、これを採取した。

【0093】

6. C a P 5：前立腺癌組織(アンドロゲン非依存性)：64歳男性、前立腺癌のため、6ヶ月間の術前アンドロゲン除去療法を施行後に前立腺全摘除術を施行された。肉眼的に癌部位から前立腺癌組織を採取した。

得られた癌組織を20倍重量のタンパク抽出液でホモジナライズし、超遠心後の上清を用

いて検討を行った。

まず、LNCaPマウス接種モデルの癌抽出液と前記ヒト前立腺組織抽出液のタンパク質濃度を公知のBradford法で定量し、SDSサンプルバッファー（SDS2%，グリセロール10%，2-メルカプトエタノール5%，プロモフェニルブルー-0.02%，0.05Mトリス-HCl、pH 6.5）で希釈して2 mg/mlに調製した。これを97°Cで15分間インキュベートしてサンプルを調製した。

【0094】

該サンプルを各10μlずつ12.5% SDS-PAGEゲルで電気泳動した。このゲルのタンパク質をPVDF膜上に転写した。これを3%ゼラチン溶液でブロッキングして、当該タンパク質の一次抗体溶液で反応させ、アルカリフォスファターゼ標識の二次抗体を反応させた。

（前立腺癌マーカボリペプチドと抗体）

使用した一次抗体は下記のとおりである。

配列番号3のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(Rad50)：市販の抗ヒトRAD50ウサギポリクローネ性抗体(AB3754, Chemicon International, Inc., CA, USA)

配列番号11のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(Mop-1)：市販の抗ヒトTOP4ウサギポリクローネ性抗体(AB5442P, Chemicon International, Inc., CA, USA)

配列番号14のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(VDAC-1)：市販の抗ヒトVDAC-1ヤギポリクローネ性抗体(sc-8828, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)

配列番号19のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(LON protease)：配列番号19のアミノ酸配列のボリペプチド断片(配列番号71)を合成し、キャリアタンパク質と組み合わせてウサギの皮下に8回接種後、血清を採取し、該血清を一次抗体として使用した。

【0095】

ボリペプチド断片 CFDIAFPDEQQEALAVER (配列番号: 71)

配列番号21のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(EBNA-2 co-activator; p100)：配列番号21のアミノ酸配列のボリペプチド断片(配列番号72)を合成し、キャリアタンパク質と組み合わせてウサギの皮下に8回接種後、血清を採取し、該血清を一次抗体として使用した。

【0096】

ボリペプチド断片 RPASPATETVPFASERTC (配列番号: 72)

配列番号30のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein)：配列番号30のアミノ酸配列のボリペプチド断片(配列番号73)を合成し、キャリアタンパク質と組み合わせてウサギの皮下に8回接種後、血清を採取し、該血清を一次抗体として使用した。

【0097】

ボリペプチド断片 CRMQAKWEEERERERLEIAR (配列番号: 73)

配列番号33のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカボリペプチド(Ublquitin-activating enzyme E1)：市販の抗ヒトUbiquitin-activating enzyme E1マウスモノクローネ性抗体(MAB3520, Chemicon International, Inc., CA, USA)

使用した二次抗体は下記とおりで、購入して使用した。

【0098】

抗マウスIgG (アルカリフォスファターゼ標識) (115-055-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA)

抗ウサギIgG (アルカリフォスファターゼ標識) (172-1016, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

抗ヤギIgG (アルカリフォスファターゼ標識) (AP-5000, Vector Laboratories, Inc., CA, USA)

(結果)

配列番号3のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(Rad50)の抗体による検出結果：

Rad50は正常前立腺組織で強い発現が認められるが、前立腺癌組織では発現が減少していた(図4)。

【0099】

配列番号1-1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(Mop-4)の抗体による検出結果：

Mop-4は正常前立腺組織で強い発現が認められるが、前立腺癌組織では発現が減少していた(図5)。

配列番号1-4のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(VDAC-1)の抗体による検出結果：

VDAC-1は正常前立腺組織で発現が少なく、前立腺癌組織では発現が増加していた(図6)。

【0100】

配列番号1-9のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(LON protease)の抗体による検出結果：

LON proteaseは正常前立腺組織で発現が少なく、前立腺癌組織では発現が増加していた。さらに、アンドロゲン依存群に比べて非依存群で発現が増加していた(図7)。

配列番号2-1のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(EBNA-2 co-activator; p100)の抗体による検出結果：

EBNA-2 co-activator; p100は正常前立腺組織で強い発現が認められるが、前立腺癌組織では発現が減少していた。また、アンドロゲン依存群に比べて非依存群で発現が増加していた(図8)。

【0101】

配列番号3-0のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein)の抗体による検出結果：

該マーカポリペプチドは、正常前立腺組織で発現が少なく、前立腺癌組織では発現が増加していた。また、アンドロゲン依存群に比べて非依存群で発現が減少していた(図9)。

【0102】

配列番号3-3のアミノ酸配列を含む前立腺癌マーカポリペプチド(Ubiquitin-activating enzyme E1)の抗体による検出結果：

Ubiquitin-activating enzyme E1は正常前立腺組織で発現が少なく、前立腺癌組織では発現が増加していた。また、アンドロゲン依存群に比べて非依存群で発現が減少していた(図10)。

【実施例】**【0103】****逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による分析**

アンドロゲン依存性、及びアンドロゲン非依存性のヒト前立腺癌における、前立腺癌マーカポリペプチドをコードする、配列番号5-3から7-0のmRNA発現レベルを、RT-PCRを用いて次のように分析することができる。

まず、前立腺組織中のmRNAの抽出を、ISOGEN RNA 分離キット(ISOGEN RNA Isolation kit, ISOGEN社)を用いて製造業者の仕様書にそって行なう。RT-PCRは、タカラRNA LA PCR キットVer. 1.1(Takara RNA LA PCR kit Ver. 1.1, タカラ酒造、大田)を用いて公知の方法に従って行なう(6)。

【0104】

すなわち、第1鎖 cDNAは総RNA (1.5μg)をテンプレートとして合成する。ランダムヘキサマー(Random hexamer, 50 pM)を5 mM MgCl₂, 1 x RNA PCR 緩衝液, 10 mM dNTP mix, 20 U リボヌクレアーゼ阻害剤を含む反応液で30°C10分、55°C15分

、99°C5分間、インキュベートする。蒸留水で40μlになるよう希釈した後、そのうちの5μlに2.5 U Tag ポリメラーゼ(タカラ酒造)、1.5 mM MgCl₂、1 x RNA PCR 機衡液、10 mM dNTP mix、そして、フォワードプライマー及びリバースプライマーそれぞれ20 pMを加え、DNA サーマルサイクラー(ASTEC、福岡)を用いて35サイクル増幅する。PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動によって分析する。この分析のために用いるプライマー／プローブのセットの最適な配列を、コンピュータによって決定する。

【0105】

本明細書の配列リストの配列番号は、以下に説明する配列を示す。なお、配列番号1～35のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、これまで前立腺癌との関係が知られておらず、本発明者らにより初めて前立腺癌との関係が知られたものである。また、配列番号36～70のボリメタオレオチドは、配列番号1～35のいずれか1のポリペプチドをコードするmRNA 又はDNAである。また、下記説明における略号「NCBI」は、データベース National Center for Biotechnology Information を意味し、「PN」は、図1及び2の電気泳動像におけるスポットの番号を意味する。

【0106】

(配列番号：1) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、KIAA0936遺伝子産物のアミノ酸配列でもある。該遺伝子産物は、脛cDNAライブラリーに見られ、モチーフデータベースから、シグナル伝達、核酸調節、細胞骨核に関与することが報告されている。NCBI Accession No.7662062, PN:029

(配列番号：2) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、TAR RNA-相互作用タンパク質 (TRIP; TAR RNA-interacting protein, TRIP) 又はTRIPポリペプチドと考えられている遺伝子産物のアミノ酸配列でもある。胎児心でmRNAが高発現することが報告されている。Reed (1998)により卵巣癌cDNAライブラリーから分離され、MSで83kDだがSDS-PAGEで160kDなので、ダイマー形成していると考えられている(Wilson, 1998)。NCBI Accession No.4758690, PN:041

(配列番号：3) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、RAD50 ホモログ (RAD50 homolog: S.cerevisiae) のアミノ酸配列でもある。該ホモログがアデノウイルスの腫瘍性タンパク質(oncoprotein)とRAD50-MRE11-NBS1複合体を不活化させて発癌性を発揮することが報告されている。

NCBI Accession No.19924129, PN:045

【0107】

(配列番号：4) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、仮想ポリペプチドPL10839のアミノ酸配列でもある。SAPモチーフがあるため、DNA結合部位を有すると思われるが、これまで機能は不明であった。

NCBI Accession No.20471264, PN:049

(配列番号：5) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、富ロイシンPPR-モチーフ包含 (Leucine-rich PPR-motif containing) 遺伝子産物のアミノ酸配列でもある。該遺伝子産物は、肝臓芽腫のcDNAで高発現し、そのアミノ酸配列から機能推定により、細胞骨格、細胞内輸送、転写、核細胞質貫通鎖に関与していると考えられている。

NCBI Accession No.18959202, PN:054

【0108】

(配列番号：6) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、RNA ヘリカーゼ KIAA0801 (RNA helicase KIAA0801) のアミノ酸配列でもある。NCBI Accession No.7662318, PN:057.2

(配列番号：7) 本発明の前立腺癌マーカポリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、ユビキチン特異性プロテアーゼ 7 (Ubiquitin specific protease 7) のアミノ酸配列でもある。該プロテアーゼ7は、P53遺伝子を安定化させてP53を介する成長阻害やアボトーシスを補助する癌抑制タンパクであると報告されている。

NCBI Accession No.4507857, PN:058

【0109】

(配列番号：8) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、カルシウム(ca2+)恒常性内部原形質網状タンパク質(Calcium (ca2+) homeostasis is endoplasmic reticulum protein)のアミノ酸配列である。該タンパク質は、脳cDNAライブラリー、又はヒト赤白血病(HEL)細胞cDNA発現ライブラリーから発現が確認され、Ca2+の恒常性に働き、分化成長に関係することが報告されている。

NCBI Accession No.18204653, PN:061

【0110】

(配列番号：9) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、MGC21133タンパク質(Nucleoporin 133kDa, Protein for MGC21133)のアミノ酸配列である。該タンパク質は、メラノーマ細胞で発現し、mRNAの核外輸送を担っているという報告がある。NCBI Accession No.18043079, PN:065

(配列番号：10) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、RNA ヘリカーゼ関連タンパク質(RNA helicase-related protein)又はその関連ボリペプチドと考えられる遺伝子産物のアミノ酸配列である。該遺伝子産物は、ヒト腎島cDNAライブラリーで確認され、デッドボックスボリペプチドファミリー(DEAD box protein family)と考えられている。NCBI Accession No.11267525, PN:069

【0111】

(配列番号：11) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、MDP-4のアミノ酸配列である。該MDP-4は、ヒト単球に発現し、ユビキチン-プロテアソーム系でのタンパク分解の第1段階でユビキチンと結合、カスケードを開始させることが報告されている。NCBI Accession No.11990422, PN:070

(配列番号：12) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、インスリン滅活酵素(Insulin-degrading enzyme)のアミノ酸配列である。該酵素は、インスリン、グルカゴン、及び β アミロイドを分解する活性を有する。アルツハイマー病では、 β アミロイドの脳脊髄液中の産生量に変化がないにもかかわらず、 β アミロイドが脳に沈着するので、該酵素の減少が原因といわれている。

NCBI Accession No.20548083, PN:091

【0112】

(配列番号：13) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、MCM5ミニクロモソーム維持欠陥5、細胞分裂サイクル46(M05 minichromosome some maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae))遺伝子産物のアミノ酸配列である。該遺伝子産物は、Burkittリンパ腫で発現することが報告されている。NCBI Accession No.13177775, PN:0102

(配列番号：14) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、電圧依存性アニオン選択性チャンネルタンパク質1(Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1))のアミノ酸配列である。該タンパク質はBCL-2ファミリーのアポトーシス調節に関与することが報告されている。

NCBI Accession No.130683, PN:231

【0113】

(配列番号：15) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、プロヒビチニン(Prohibitin)のアミノ酸配列である。プロヒビチニンは、DNA合成阻害、及びpHの変異により乳癌発症に関与する可能性が報告されている。

NCBI Accession No.464371, PN:244.2

(配列番号：16) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、ニップスナップ1タンパク質(nipSnap1 protein)のアミノ酸配列である。該タンパク質は、C. elegans(C. elegans)染色体IIIの遺伝子産物に類似し、細胞内顆粒移動に関係することが報告されている。NCBI Accession No.17380144, PN:258

(配列番号：17) 本発明の前立腺癌マーカボリペプチドのアミノ酸配列を示す。該配列は、ペロキシレドキシン4(Peroxiredoxin 4)のアミノ酸配列である。該タン

パク質は、サイトカインや免疫系の転写に関与していることが報告されている。

NCBI Accession No.3024727, PN:259

【0114】

(配列番号：1 8) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、スプライシングコアクチベータサブユニットSRm300 (Splicing coactivator subunit SRm300) のアミノ酸配列でもある。該サブユニットSRm300は、RNA結合性ボリペプチド及び

AT-富要素結合因子などとして知られている。SRM160及び前駆Smrと会合して、核スペックル内に存在し、SRM160/SRM300デブリートスプライシング反応の再構成に関与することが報告されている。NCBI Accession No.19923466, PN:002

(配列番号：1 9) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、ロンプロテアーゼホモログ (Lon protease homolog) のアミノ酸配列でもある。該ホモログは、DNA損傷時にSOS遺伝子群が誘導され、その修復に働くことが報告されている。

NCBI Accession No.12644239, PN:092, 2

【0115】

(配列番号：2 0) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、ピュロマイシン感受性アミノペプチダーゼ (Puromycin-sensitive aminopeptidase) のアミノ酸配列でもある。該ペプチダーゼは神経ペプチドの活性化、細胞増殖と多様性に必要なプロテアーゼであり、胎児脳のcDNAライブライラーから同定され、かつ白血病細胞でビタミンDで刺激することができるが報告されている。NCBI Accession No.2499902, PN:099

(配列番号：2 1) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、EBNA-2 コアクチベータ (EBNA-2 co-activator (100kD)) のアミノ酸配列でもある。EBNA-2 コアクチベータは、特定遺伝子の翻訳を活性化し、かつEV関連の細胞の転写に必須であり、さらにショウジョウバエのメラニン合成に関与することが報告されている。

NCBI Accession No.7657431, PN:116, 088

【0116】

(配列番号：2 2) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、異種核酸リボ核ボリペプチドD様ホモログ (JKTBP) のアミノ酸配列でもある。該ホモログについて、RNAのスプライシングと移動に関与することが報告されている。

NCBI Accession Nos.7446333, 4512253, PN:223

【0117】

(配列番号：2 3) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるボリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、GTP-結合性タンパク質ベータ鎖ホモログ (GTP-binding protein beta chain homolog) のアミノ酸配列でもある。該ホモログは、GTP-結合性ボリペプチドB鎖ホモログ、IMC B複合ボリペプチド12.3などとして知られ、リンパ球活性化機能、インスリン様生育因子(IGF-1)であるラット-RACK1 (Rn.2568) のレセプターと類似することなどが報告されている。

NCBI Accession No.5174447, PN:233, 237

【0118】

(配列番号：2 4) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非

依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、核・塩素イオンチャネルタンパク質(Nuclear chloride ion channel protein)のアミノ酸配列でもある。NCBI Accession No.2073569, PN:243

(配列番号：25) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、ウィリアム・ベウレン症候群染色体領域1ホモログ(William-Beuren syndrome chromosome region 1 h omolog)のアミノ酸配列でもある。該ホモログは、Wbscr1 代用スプライス産物、及び William-Beuren症候群染色体領域1ホモログ等として知られ、mRNA利用のレベルでポリペプチド合成の開始を刺激する機能が報告されている。

NCBI Accession No.18204592, PN:251

【0119】

(配列番号：26) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、抗酸化性タンパク質2(Antioxidant protein 2)のアミノ酸配列でもある。該タンパク質は、細胞のレドックス制御に関連し、過酸化水素を減らし、鎖短有機脂肪酸及びリン脂質過酸化物を減らし、リン脂質の代謝制御及び酸化障害に対する防御における役割が報告されている。

NCBI Accession Nos.1718024, 4758638, PN:26

(配列番号：27) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、ペルオキシレドクシン1(Peroxiredoxin 1)のアミノ酸配列でもある。ペルオキシレドクシン1は、細胞内の過酸化水素を調節することで生育因子とTNF α のシグナル伝達をコントロールしており、酸化ストレス下に出現するということが報告されている。

NCBI Accession No.548453, PN:284

【0120】

(配列番号：28) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は上昇する。該配列は、コフィリン非筋肉アソフォーム(Cofilin, non-muscle isoform)(18 kDa リンポリペプチド)1のアミノ酸配列でもある。該アソフォームは、アクチンと結合し、その細胞質から核への移動を助け、LIM-キナーゼによりリン酸化された際、アクチンを脱重合させることが報告されている。NCBI Accession No.116848, PN:297

(配列番号：29) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、クルッペルタイプ亜鉛フィンガータンパク質(Kruppel-type zinc finger protein, PEG3)のアミノ酸配列でもある。該タンパク質は、成人脳で高発現し、グリオーマ細胞にトランスクレクションさせると癌原性消失するので腫瘍抑制ポリペプチドと考えられている。

NCBI Accession No.11494024, PN:028

【0121】

(配列番号：30) 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、スカフォルドアッタッチメント因子B、又はHSP27 ERE-TATA-結合性タンパク質(Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein)のアミノ酸配列でもある。該タンパク質は、HSP27プロモーター結合タンパクで、各種乳癌の細胞ラインの核内で発現し、乳癌の原因遺伝子候補と考えられている。NCBI Accession No.21264343, PN:043

(配列番号： 3 1 ） 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、スプライソゾーム関連タンパク質130 (Spliceosome-associated protein 130) のアミノ酸配列である。

該タンパク質は、スプライシング因子3b、サブユニット3(130kDa)及びスプライセオゾーム会合ポリペプチド130などとして知られ、スプライセオゾームにおいて機能する複合体SF3 bの構成要素であることが報告されている。

NCBI Accession No.11034823, PN:059

【0122】

(配列番号： 3 2 ） 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、T細胞により認識される扁平上皮癌抗原3 (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cell 1s 3, SART3) のアミノ酸配列である。該抗原は、腫瘍特異性T細胞を誘導して腫瘍免疫に働き、また、mRNAスプライシングにも関与すること、及び大腸癌で発現、正常組織では発現していないことが報告されている。

NCBI Accession No.7661952, PN:062

【0123】

(配列番号： 3 3 ） 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、ユビキチン活性化酵素E 1 (Ubiquitin-activating enzyme E1) のアミノ酸配列である。ユビキチン活性化酵素E 1は、ユビキチーニングテアソーム系でのタンパク分解の第1段階でユビキチンと結合、カスケードを開始させることが報告されている。

NCBI Accession No.4507763, PN:074.2, 078

【0124】

(配列番号： 3 4 ） 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、カリオフェリン(karyopherin)-ベータ1、又はインポルチン(importin)-ベータ1のアミノ酸配列である。該遺伝子産物は、核内シグナルをもつタンパクと結合して、このタンパクを細胞質から核内へ輸送し、RANと結合することにより輸送は終了することが報告されている。NCBI Accession No.19923142, PN:103

(配列番号： 3 5 ） 本発明のアンドロゲン依存性前立腺癌マーカ、及びアンドロゲン非依存性前立腺癌マーカとなるポリペプチドのアミノ酸配列である。前立腺癌がアンドロゲン非依存性を獲得すると、該癌マーカの発現は低下する。該配列は、ha1225 遺伝子産物 (The ha1225 gene product) のアミノ酸配列である。該遺伝子産物は、ヒト α グルコシダーゼに関連することが報告されている。

NCBI Accession No.577295, PN:118

【0125】

(配列番号： 3 6 ） 配列番号1の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号： 3 7 ） 配列番号2の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号： 3 8 ） 配列番号3の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号： 3 9 ） 配列番号4の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号： 4 0 ） 配列番号5の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

【0126】

(配列番号：4 1） 配列番号6の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 2） 配列番号7の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 3） 配列番号8の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 4） 配列番号9の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 5） 配列番号10の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

【0127】

(配列番号：4 6） 配列番号11の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 7） 配列番号12の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 8） 配列番号13の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：4 9） 配列番号14の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 0） 配列番号15の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 1） 配列番号16の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

【0128】

(配列番号：5 2） 配列番号17の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 3） 配列番号18の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 4） 配列番号19の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 5） 配列番号20の前立腺癌マーカするmRNA又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 6） 配列番号21の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 7） 配列番号22の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

【0129】

(配列番号：5 8） 配列番号23の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：5 9） 配列番号24の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：6 0） 配列番号25の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：6 1） 配列番号26の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：6 2） 配列番号27の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又是cDNAのスクレオチド配列を示す。

【0130】

(配列番号：6 3） 配列番号28の前立腺癌マーカポリペプチドをコードするmRNA 又

はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：64) 配列番号29の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：65) 配列番号30の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：66) 配列番号31の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：67) 配列番号32の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：68) 配列番号33の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

【0131】

(配列番号：69) 配列番号34の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：70) 配列番号35の前立腺癌マーカボリペプチドをコードするmRNA 又はcDNAのスクレオチド配列を示す。

(配列番号：71) 配列番号19の前立腺癌マーカボリペプチドのポリペプチド断片のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：72) 配列番号21の前立腺癌マーカボリペプチドのポリペプチド断片のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：73) 配列番号30の前立腺癌マーカボリペプチドのポリペプチド断片のアミノ酸配列を示す。

【0132】

(参考文献)

- Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I. Optimal timing and dosage of chemotherapy as a combined treatment with androgen withdrawal in the human prostate LNCaP tumour model. Br J Cancer. 2001; 84:859-63.
- Oh-Ishi M, Satoh M, Maeda T. Electrophoresis. 2000 May; 21(9): 1653-69
- Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 1995, 16: 1034-59
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature 1996, 379: 466-9
- Molecular Cloning, 2nd Ed, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)
- Uchida T, Gao JP, Wang C et al. Mol Urol. 2001 Summer;5(2):71-8

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】図1は、高分子量領域に重点をおいた6-10%濃度勾配ゲルのアガロース2次元電気泳動により得られた、前立腺癌に含まれるタンパク質の分布マップを示す。

【図2】図2は、中低分子量領域に重点をおいた12%濃度均一ゲルのアガロース2次元電気泳動により得られた、前立腺癌に含まれるタンパク質の分布マップを示す。

【図3】図3は、アンドロゲン依存群、及びアンドロゲン非依存群において、量的増減を示したタンパク質スポットと、その定量比較グラフを示す。

【図4】図4は、前立腺癌マーカボリペプチドであるRad50の前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図5】図5は、前立腺癌マーカボリペプチドであるMop-4の前立腺癌組織における発現を

示す電気泳動の像である。

【図6】図6は、前立腺癌マーカポリペプチドであるVDAC-1の前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図7】図7は、前立腺癌マーカポリペプチドであるLON proteaseの前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図8】図8は、前立腺癌マーカポリペプチドであるEBNA-2 co-activator; p100の前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図9】図9は、前立腺癌マーカポリペプチドであるScaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding proteinの前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図10】図10は、Ubiquitin-activating enzyme E1の前立腺癌組織における発現を示す電気泳動の像である。

【図1】

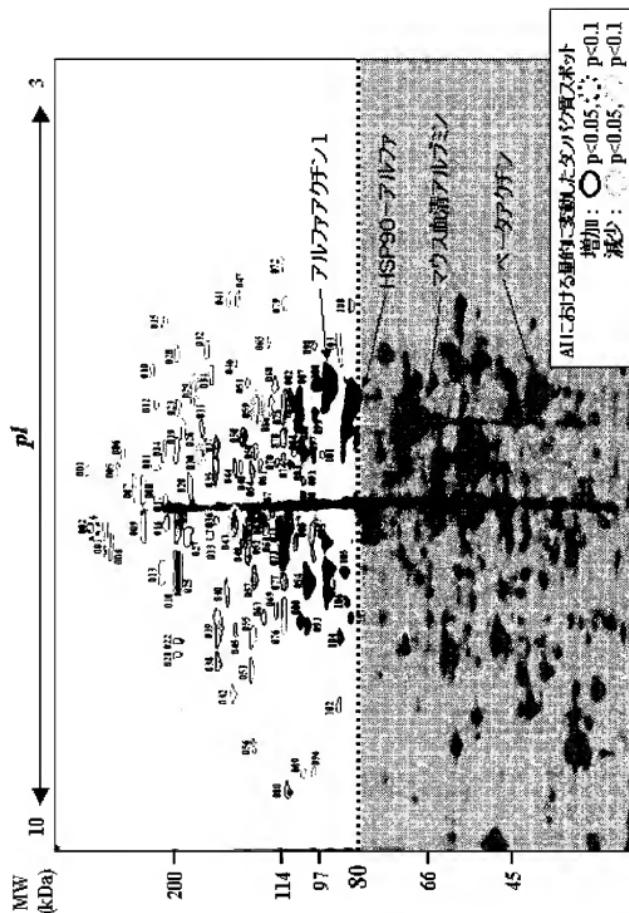


図1

【図2】

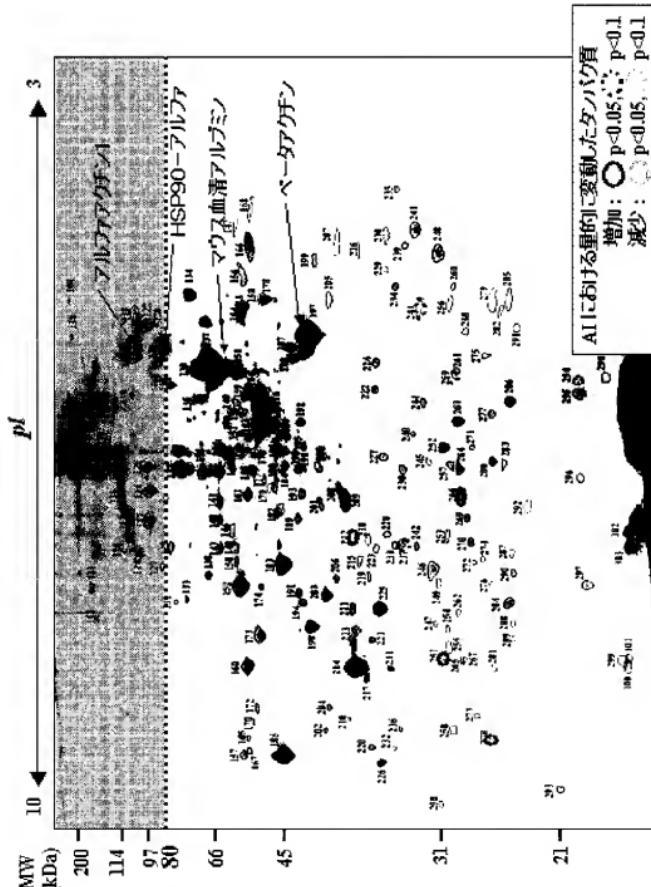
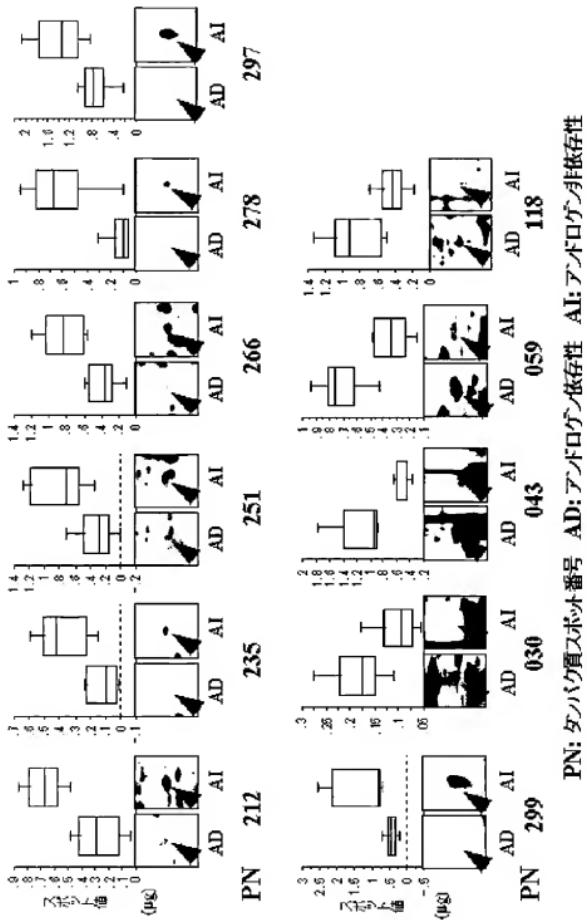


図2

【図3】

アンドロゲン非依存群で量的変動を示したスポット ($p < 0.05$)



PN: ダーバク質スポット番号 AD: アンドロゲン依存性 AI: アンドロゲン非依存性

図3

【図4】

PN 045 (配列番号:3) RAD50

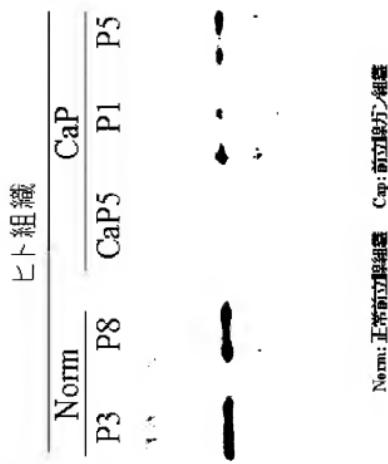


図4

PN 070 (配列番号:11) MOP-4

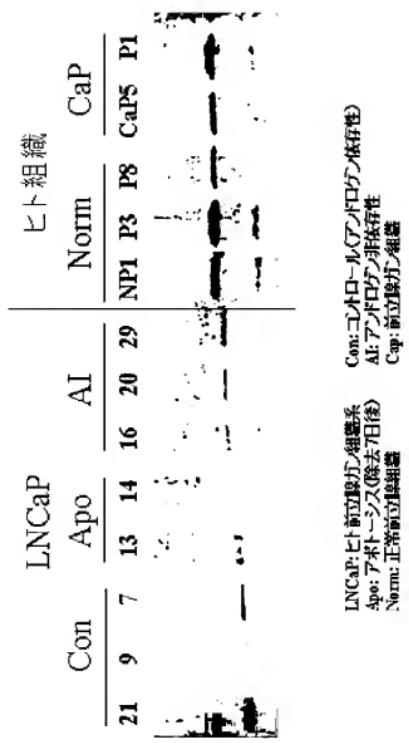


図5

【図5】

【図6】

PN 231 (配列番号:14) VDAC-1

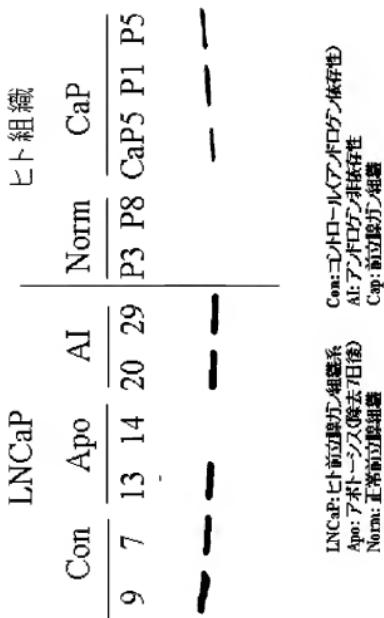


図6

【図7】

アンドロゲン非依存性マーカー(AIで増加)

PN 092.2 (配列番号: 19) LONプロテアーゼ

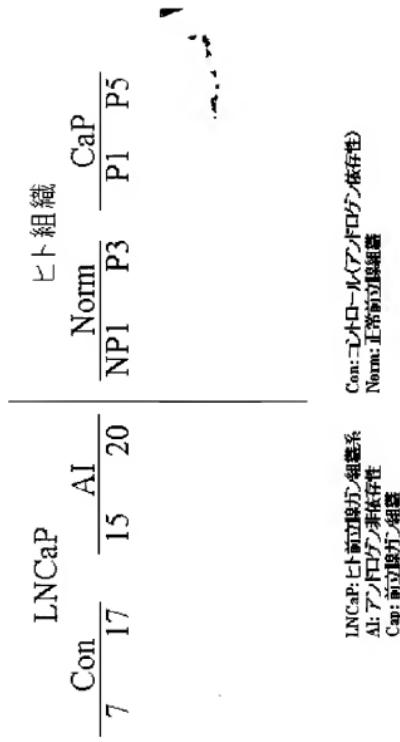


図7

【図8】

アンドロゲン非依存性マーカー(AI)で増加

PN 116(配列番号:21) EBNA-2コアクチベータ; p100

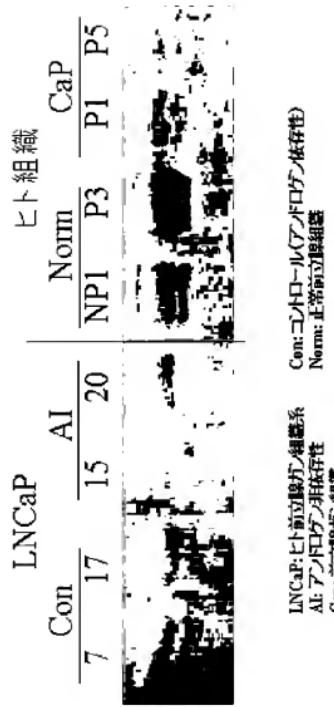


図8

【図9】

アンドロゲン非依存性マーカー(AIで減少)

PN 043(配列番号:30) スカルフォドアタッチメント因子B、
HSP27 ERE-TATA結合性タンパク質

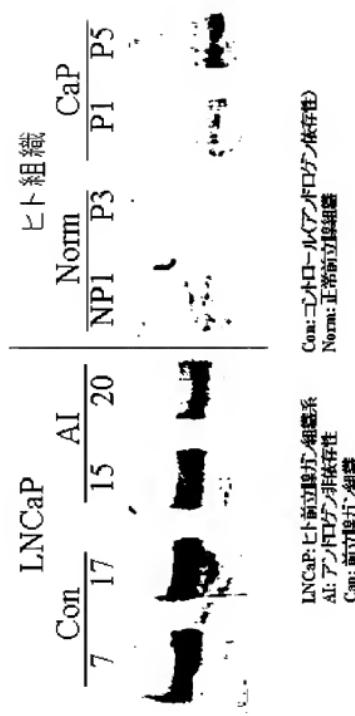


図9

【図10】【配列表】
2005080524000001.app

アンドロゲン非依存性マーカー(AIで減少)

PN 078 (配列番号:33) ユビキチン活性化酵素 E1

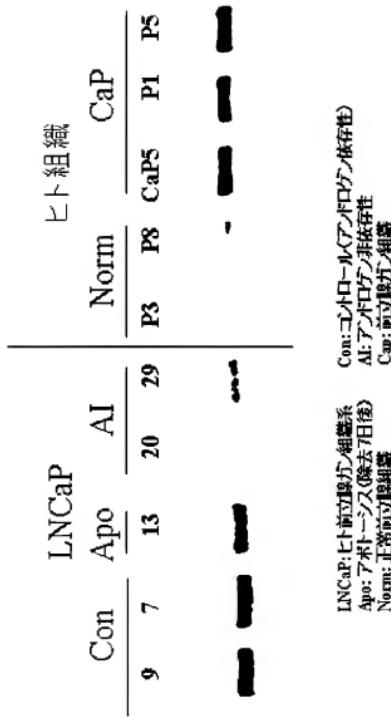


図10

(51)Int.Cl.⁷

C 07 K 16/32
 C 12 P 21/08
 C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/53
 G 01 N 33/566
 G 01 N 33/574

F I

C 07 K 14/82
 C 07 K 16/32
 C 12 P 21/08
 C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/53
 G 01 N 33/53
 G 01 N 33/566
 G 01 N 33/574

テーマコード(参考)

A
D
M
Z

(72)発明者 馬場 志郎

神奈川県横浜市神奈川区片倉町117番62号

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BM5 CA04 CA09 CA12 EA04 GA11 HA14
 4B063 QA18 QA19 QQ42 QQ53 QR55 QR62 QS25 QS34
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC21 DA14
 4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 DD22 EE01
 4H045 AA11 BA10 CA41 DA76 DA86 EA28 EA51 FA71 FA72

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

[0001]

This invention relates to the diagnosing method of the prostatic cancer using the antibody to prostatic marker polypeptide and this polypeptide, and this polypeptide. When it states still in detail, it is related with the diagnosing method and the medicinal composition for a therapy of the prostatic cancer which used specific marker polypeptide, the antibody to them, this marker polypeptide, and an antibody for an androgen dependency prostatic cancer and each androgen non-dependency prostatic cancer.

[Background of the Invention]

[0002]

Although prostatic cancers are male morbidity primacy and the cancer of the 2nd place of mortality rate in the U.S. and the patient number is increasing rapidly under the influence of aging and West-izing of a life even in Japan in recent years, since a prostatic cancer does not have an initial symptom, it is discovered in the state of the advanced cancer accompanied by metastasis in many cases.

Although the prostatic specific antigen (Prostatic pecific Antigen; PSA) is widely used as a tumor marker of a prostatic cancer now, By diagnosis using PSA, there are problems, like there is much false positivity and the border area of a good nature and malignancy is large (nonpatent literature 1), and a new tumor marker has been examined. For example, the tumor marker originating in 20PIF12/TMPRS2 which is the cell surface serine protease adjusted by the androgen of prostatic cancer singularity (patent documents 1), It is a tumor marker (patent documents 3) accompanying discovery of C type lectin film penetration antigen (patent documents 2) revealed in the Homo sapiens prostatic cancer, and much other prostatic cancer specific protein, etc. However, the prostatic marker which enables diagnosis highly accurate until now was not discovered or put in practical use.

[0003]

In order to increase, a male sex hormone (androgen) is required for an early prostatic cancer, therefore an androgen interception therapy is performed. On the other hand, in order that this prostatic cancer may acquire an androgen non-dependency and may begin repopulation, the effect of this interception therapy is usually lost within two years. Therefore, since many patients will die within one year if a prostatic cancer acquires an androgen non-dependency, Although it was important to judge whether a prostatic cancer has acquired the androgen non-dependency, the prostatic marker in which acquisition of an androgen non-dependency is shown did not exist,

and had not enforced any cures other than hormone therapy since the early stage to an androgen non-dependency prostatic cancer.

[Patent documents 1] The ** table No. 517185 [2002 to] gazette

[Patent documents 2] The ** table No. 507042 [2003 to] gazette

[Patent documents 3] The ** table No. 520054 [2002 to] gazette

[Nonpatent literature 1] Chan DW, Sokoll LJ. Prostate-specific antigen: update 1997. *J IntFed Clin Chem* 1997; 9: 120-5

[Description of the Invention]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

[0004]

This invention Androgen dependency prostatic cancer marker polypeptide and androgen non-dependency prostatic cancer marker polypeptide, It aims at providing the diagnosing method and the medicinal composition for a therapy of the prostatic cancer which used a specific antibody, this marker polypeptide, and an antibody for this marker polypeptide.

[Means for Solving the Problem]

[0005]

This invention persons took out protein from prostate cancer tissue, combined the agarose 2DE method, liquid chromatography, or tandem mass spectrometry, and analyzed expression protein with a proteome analysis. As a result, polypeptide which newly serves as a marker of an androgen dependency prostatic cancer and an androgen non-dependency prostatic cancer out of protein registered into a Gene Bank database was able to be found out. This invention is made based on this result of research.

[0006]

Therefore, this invention provides prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

This invention from any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35. Variation polypeptide which derives an antibody production to prostatic marker polypeptide which includes an amino acid sequence which varied by one or more amino acid residue substitution, deletion, addition, and/or insertion, and includes any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 is provided.

[0007]

This invention provides a polypeptide fragment which derives an antibody production to prostatic marker polypeptide which is following (1) or a polypeptide fragment of (2), and includes any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

(1) Prostatic marker polypeptide including the array number 1 - 35 any 1 amino acid sequences; reach.

(2) Any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 to one or more amino acid residue substitution, It is the polypeptide which derives an antibody production to prostatic marker polypeptide which includes an amino acid sequence which varied by deletion, addition, and/or insertion, and includes any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

[0008]

Furthermore, this invention provides a diagnosing method of a prostatic cancer detecting at least one sort of prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

This invention provides a diagnosing method of an androgen non-dependency prostatic cancer detecting at least one sort of prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35.

This invention provides a constituent for antibody manufacture which has singularity to prostatic marker polypeptide containing following (a), (b), or (c) including an amino acid sequence indicated to any 1 of the array numbers 1-35.

(a) Polypeptide including an amino acid sequence indicated to any 1 of the array numbers 1-35;
(b) Any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 to one or more amino acid residue substitution, Polypeptide which derives an antibody production to prostatic marker polypeptide which includes an amino acid sequence which varied by deletion, addition, and/or insertion, and includes any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35; it reaches.

(c) It is a polypeptide fragment of (a) or (b), and is a polypeptide fragment which derives an antibody production to prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

[0009]

Furthermore, this invention provides an antibody which has singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

Furthermore, this invention provides a method of manufacturing an antibody which has singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35, including medicating mammalian with said constituent for antibody manufacture. Furthermore, this invention provides a medicinal composition for prostate cancer treatment containing at least one sort of antibodies which have singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

Furthermore this invention an antibody which has singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35, A medicinal composition for androgen non-dependency prostate cancer treatment contained at least one sort or a medicinal composition for androgen non-dependency prostatic cancer formation inhibition is provided.

[0010]

Furthermore, this invention provides a kit for prostatic cancer diagnosis containing at least one sort of antibodies which have singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

Furthermore, this invention provides prostatic cancer Ma^{Pu} CHIDO including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35 with a kit for androgen non-dependency prostatic cancer diagnosis containing at least one sort of antibodies which have singularity.

Furthermore, this invention provides a nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis containing the following (i) and (iii).

(i) Polynucleotide which has any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, and a

complementary nucleotide sequence;

(ii) nucleotide fragment; including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, and a partial sequence of a complementary nucleotide sequence -- or

(iii) They are polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, polynucleotide hybridized under stringent conditions, or a nucleotide fragment.

[0011]

This invention provides a diagnosing method of a prostatic cancer including detecting at least one sort of polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70.

A primer for prostatic cancer diagnosis this invention is furthermore characterized by that comprises the following (reverse primer).

A primer for prostatic cancer diagnosis (forward primer) which consists of a nucleotide fragment including a partial sequence of any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, and any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70.

A nucleotide fragment including a partial sequence of a complementary nucleotide sequence.

[0012]

Furthermore, this invention provides a kit for prostatic cancer diagnosis containing said nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis.

Furthermore, this invention provides a nucleic acid probe for androgen non-dependency prostatic cancer diagnosis containing the following (iv), (v), or (vi).

(iv) Polynucleotide which has any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70, and a complementary nucleotide sequence;

(v) nucleotide fragment; including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70, and a partial sequence of a complementary nucleotide sequence -- or

(vi) They are polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70, polynucleotide hybridized under stringent conditions, or a nucleotide fragment.

[0013]

Furthermore, this invention provides a diagnosing method of an androgen non-dependency prostatic cancer including detecting at least one sort of polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70.

A primer for androgen non-dependency prostatic cancer diagnosis this invention is furthermore characterized by that comprises the following (reverse primer).

A primer for androgen non-dependency prostatic cancer diagnosis (forward primer) which consists of a nucleotide fragment including a partial sequence of any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70, and any 1 nucleotide sequence of the array numbers 54-70.

A nucleotide fragment including a partial sequence of a complementary nucleotide sequence.

[0014]

Furthermore, this invention provides a kit for androgen non-dependency prostatic cancer diagnosis containing said nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis.

(Definition)

A term "prostatic marker polypeptide" used on these specifications means polypeptide separated into the Homo sapiens prostate cancer cells which were extracted from the Homo sapiens prostate-cancer-cells extract, and were produced by developing on gel by agarose two dimensional electrophoresis from a specific spot. Although this prostatic marker polypeptide is polypeptide generally revealed from prostate cancer cells, there are some from which an expression amount changes characteristic in prostate cancer cells which acquired an androgen non-dependency. The prostatic marker polypeptide concerned contains polypeptide of a gestalt dissociated or isolated from a cancer cell.

[0015]

A term "antibody in a blood serum" used in this specification exists in a blood serum, and means antibody IgG combined with polypeptide which contains any 1 in the array numbers 1-35. A term "antibody" used in this specification and a "mark type-ized antibody" mean polypeptide which contains any 1 in the array numbers 1-35, the variation polypeptide and a polyclonal antibody created considering these polypeptide fragments as immunogen, or a monoclonal antibody.

[Effect of the Invention]

[0016]

Prostatic marker polypeptide, androgen non-dependency prostatic cancer marker polypeptide which are new and were excellent by this invention, The diagnosing method and the medicinal composition for a therapy of the prostatic cancer which used a specific antibody, this marker polypeptide, and an antibody for these prostatic cancer marker polypeptide can be obtained.

[Best Mode of Carrying Out the Invention]

[0017]

(Prostate cancer tissue used for search of prostatic marker polypeptide)

The androgen dependency prostate cancer cells and androgen non-dependency prostate cancer cells which are used for prostatic marker polypeptide search of this invention can be created by the method known conventionally (1). For example, the LNCaP cell strain (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA) marketed can be used as androgen dependency Homo sapiens prostate cancer cells. The culture culture medium which contains 10% of foetal calf serum for this LNCaP cell strain. (For example, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium) It maintains in inside, After cultivating, this culture LNCaP cell 1×10^7 individual is mixed in 0.1 ml Matrigel (Matrigel, Becton Dickinson Labware, NJ, USA), The hypodermic of male nude-mouse (BALB/c strain) is inoculated, and the extirpation of the testis is carried out in the place where a tumor became 200 mm^3 from 100. Although this tumor is reduced primarily, repopulation is begun soon. The tumor which carried out repopulation of the tumor in front of the testis extirpation at this time after an androgen dependency prostatic cancer and a testis extirpation can be used as an androgen non-dependency prostatic cancer.

[0018]

(Extraction of Homo sapiens normal prostatic glandular tissue and the Homo sapiens prostate

cancer tissue)

The Homo sapiens normal prostatic glandular tissue used by this invention and prostate cancer tissue were extracted from the extirpation sample of the patient who performed an operation. Mainly by the Kitasato University Hospital urology department in Sagamihara-shi, Kanagawa, consent is acquired from the patient who underwent the operation and it is extracted. This normal prostatic glandular tissue is extracted from the prostate gland by which merger excision is carried out simultaneously, for example, when a bladder full extraction is performed for urinary bladder cancer treatment. When a prostatectomy was carried out by prostatomegaly, noncancerous prostatic glandular tissue was also extracted. Furthermore, the Homo sapiens prostatic glandular tissue is extracted at the time of the prostate gland by which an extirpation is carried out, or the prostate biopsy way carried out in the case of prostatic cancer diagnosis, when a prostate gland full extraction or a prostatectomy is performed for prostate cancer treatment. At this time, the male sex hormone interception therapy is given a priori, and the prostatic cancer of the case in which a prostatic cancer began repopulation was made into an androgen non-dependency prostatic cancer.

[0019]

(Search of prostatic marker polypeptide)

The polypeptide contained in the cell extract obtained from the prostate cancer tissue for said search was developed on gel with the agarose two dimensional electrophoresis which is a conventional method (2). That is, it is a technique (two-dimensional eye) which separates proteinic mixed liquor by the electric charge (isoelectric point) which each protein holds first (one-dimensional eye), and is continuously separated with a molecular weight. The most general method is fixed pH inclination two dimensional electrophoresis (potato villa yne 2DE), for example, can be enforced using the kit currently sold from Amersham Biosciences K.K.

[0020]

Although this method is the technique of using for a one-dimensional eye the polyacrylamide gel by which pH inclination was fixed beforehand, and separating protein with a molecular weight by SDS polyacrylamide gel continuously, In order to use acrylamide gel for a one-dimensional eye, there is a fault that the amount protein of polymers is inseparable (3).

[0021]

The agarose two dimensional electrophoresis which this invention persons used conquers this fault by using agarose gel for a one-dimensional eye. The technique of this typical agarose two dimensional electrophoresis is explained. First, agarose 1%, 12% of D-sorbitol, 5M urea, 1M thiourea, and a carrier ampholite (for example, a FARUMA light and Amersham Biosciences (K.K.)) are mixed, it pours into the glass tube of diameter 3.4 mm and length 180 mm, and the gel of a one-dimensional eye is created. Samples, such as protein mixed liquor, a cell extract, a tissue extract, or a blood serum, are injected into this end, and structure and isoelectric focusing are performed for electric inclination by applying the voltage of 500-1000 volts. A two-dimensional eye creates the SDS-polyacrylamide gel prepared to 5 to 20% of concentration, and applies electrophoresis (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Desired time,

after carrying out electrophoresis, two-dimensional-electrophoresis gel is dyed and visualized by the Cooma Gee dyeing, argentation, the SHIPRO ruby dyeing, etc. Thus, the polypeptide contained in a sample can be obtained as a spot on gel.

[0022]

(Identification of the polypeptide (protein) on gel)

A proteome analysis can perform identification of this polypeptide. That is, it can carry out by the publicly known method which combined with agarose two dimensional electrophoresis fluid chromatogram tandem-mass-spectrometry method (LC/MS/MS) formed into the automatic line (4). That is, the protein spot of gel is first decomposed into peptide by digesting in gel with trypsin etc. If each peptide fragments of various length cut by various parts are measured by LC/MS/MS, the exact mass of peptide can obtain as mass product ion or a mass tag. The database produced by genomics can be searched using the data of the mass spectrum of this mass tag, and polypeptide can be identified. This invention persons analyzed the mass spectrum data of these peptide fragments using analysis software (SEQUEST), and identified them using the database of the U.S. NCBI.

[0023]

(Quantitive spot analysis of two-dimensional-electrophoresis gel)

It downloads to a computer by making the image of this gel into a graphics file after desiccation of two-dimensional-electrophoresis gel, Under [a fixed quantity for every protein spot using image-analysis software (for example, Phoretix 2D Advanced Version 5.01 (Nonlinear Dynamics Ltd, UK) etc.)]. By the same image-analysis software, since conformity of the protein spot of each gel and analysis were completed, the comparative examination according to control group was performed using the statistical techniques, such as a T-test, from here.

[0024]

(Prostatic marker polypeptide)

By this invention, prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 was able to be obtained with such two-dimensional-electrophoresis gel and a proteome analysis. The relation with a prostatic cancer was not known at all until this invention persons found out, although the respectively specific organ etc. which are functioned or revealed were known such polypeptides. Therefore, this invention persons found out that such polypeptides could use as a prostatic marker for the first time.

[0025]

The prostatic marker polypeptide of this invention is listed by the name etc. which were known conventionally. The number given to each marker polypeptide is in agreement with the amino acid sequence number of the array table attached to this specification. The concrete identification procedure of this prostatic marker is concretely indicated in the Examples 1-3 of this specification.

[0026]

1. KIAA0336 Gene product (KIAA0336 gene product)

2. TAR RNA-interaction protein (TRIP TAR RNA-interacting protein, TRIP)

3. RAD50 Homologue (RAD50 homolog)
4. Virtual protein FLJ10839 (Hypothetical protein FLJ10839)
5. Wealth leucine PPR-motif inclusion (Leucine-rich PPR-motif containing)
6. RNA helicase KIAA0801 (RNA helicase KIAA0801)
7. Ubiquitin singularity protease 7 (Ubiquitin specific protease 7)
8. Calcium (ca²⁺) homeostasis endoplasm reticulum protein
(Calcium (ca²⁺) homeostasis endoplasmic reticulum protein
[0027])
9. Related NUKUREOPORIN 133kDa or MGC21133 protein
(Nucleoporin 133kDa, Protein for MGC21133)
10. RNA helicase related protein (RNA helicase-related protein)
11. MOP-4(MOP-4)
12. Insulin degradation enzyme (Insulin-degrading enzyme)
13. MCM5 The minichromosome maintenance defect 5, cell fractionation cycle 46
(MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae))
14. Voltage dependency anion selector-channel protein 1 or VDAC1
(Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1))
[0028]
15. Pro HIBICHIN (Prohibitin)
16. NipSnap1 protein (NipSnap1 protein)
17. PEROKISHIREDOKISHIN 4 (Peroxiredoxin 4)
18. Splicing coactivator subunit SRm300
(Splicing coactivator subunit SRm300)
19. ROMPUROTE ase homologue (Lon protease homolog)
20. Puromycin susceptibility aminopeptidase
(Puromycin-sensitive aminopeptidase)
[0029]
21. EBNA-2 (EBNA-2 co-activator (100kD)) Coactivator (100kD)
22. JKTBP1
23. GTP-unity protein beta chain homologue
(GTP-binding protein beta chain homolog)
24. A core and chlorine ion channel protein
(Nuclear chloride ion channel protein)
25. William BEUREN syndrome chromosome region 1 homologue
(William-Beuren syndrome chromosome region 1 homolog)
26. antioxidant protein 2 (Antioxidant protein 2)
[0030]
27. Peroxy REDOKUSHIN 1 (Peroxiredoxin 1)
28. Coffey Lynne 1 (Cofilin 1)
29. KURUPPERU type zinc finger protein or PEG3

(Kruppel-type zinc finger protein, PEG3)

30. The SUKAFU fold ATTATCHIMENTO factor B or HSP27 ERE-TATA-unity protein

(Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein)

31. SUPURAISOZOMU related protein 130 (Spliceosome-associated protein 130)

32.T The squamous cell carcinoma antigen 3 recognized by a cell, or SART3

(Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3, SART3)

33. ubiquitin activation enzyme E1 (Ubiquitin-activating enzyme E1)

34. KARIOFERIN (impotence rutin) beta 1 (Karyopherin (importin) beta 1)

[0031]

35. ha1225 Gene product (The ha1225 gene product)

Six marker polypeptides in which the marker polypeptide which increased these prostatic cancer marker polypeptide by the non-dependency group in $p < 0.1$ when the comparative examination of the manifestation was statistically carried out by the group of an androgen dependency prostatic cancer and the group of an androgen non-dependency prostatic cancer decreased by 12 pieces were accepted. That is, the specific marker was especially found out by the androgen non-dependency prostatic cancer among said prostatic marker polypeptides. The marker polypeptide of this androgen non-dependency prostatic cancer is as follows.

[0032]

(Marker polypeptide which an expression amount increases after acquiring an androgen non-dependency)

18. Splicing coactivator subunit SRm300

19. ROMPUROTE ase homologue

20. Puromycin susceptibility aminopeptidase

21. EBNA-2 Coactivator (100kD)

22.JKTBP1

23. GTP-unity protein beta chain homologue

24. A core and chlorine ion channel protein

25. William BEUREN syndrome chromosome region 1 homologue

26. Antioxidant protein 2

27. Peroxy REDOKUSHIN 1

28. Coffey Lynne 1

(Marker polypeptide in which an expression amount decreases after acquiring an androgen non-dependency)

[0033]

29. KURUPPERU type zinc finger protein

30. The SUKAFU fold ATTATCHIMENTO factor B or HSP27 ERE-TATA-unity protein

31. SUPURAISOZOMU related protein 130

32.T The squamous cell carcinoma antigen 3 recognized by a cell

33. Ubiquitin activation enzyme E1

34. KARIOFERIN (impotence rutin) beta 1

35. ha1225 Gene product

[0034]

Therefore, when said prostatic marker polypeptide of 1-35 is found out in the blood of the subject etc. by the inspection using an antibody etc., this test subject can be judged to be a prostate cancer patient or a prostatic cancer high-risk person. To a test subject, at least one sort of increases in said prostatic marker polypeptide of 18-28, And/or, when at least one sort of reduction of the prostatic marker polypeptide of 29-35 is observed, this test subject has an androgen non-dependency prostatic cancer, or can judge with the high-risk person.

[0035]

Therefore, a prostatic cancer can be diagnosed as the sample obtained from the test subject by detecting this prostatic marker polypeptide. An androgen non-dependency prostatic cancer can be diagnosed by detecting at least one sort of prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35 from the sample obtained from the test subject.

Detection of this prostatic marker polypeptide can be performed by contacting the sample obtained from the test subject, and the antibody to this prostatic marker polypeptide.

[0036]

The antibody used by this invention is an antibody which has singularity in prostatic marker polypeptide, including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35. These antibodies may be any of a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

When the immunoassay (measurement) method using the antibody of this invention is mentioned, enzyme immunoassay (EIA), There are the enzyme immuno metric assaying method (ELISA), fluoroimmunoassay (FIA), a radioimmunity measuring method (RIA), luminometrical immunoassay, immuno blotting methods, western blotting, an immunostaining method, etc.

Western blotting is effective in order to know the molecular weight of the protein concerned which exists in biological material. After this method carries out acrylamide gel electrophoresis of the biological material liquid, such as a crude extract of organ organization origin, transfer it to a membrane, it is made to react to the antibody which recognizes the protein concerned or the peptide concerned, and detects the immune complex to generate using the sign second antibody, for example. In this method, the amount of signs of the sign second antibody combined with this immune complex is measured.

[0037]

The immunostaining method is effective in order to analyze an organization and the manifestation part of the object polypeptide in a cell. For example, this method makes an organization section, a cell, etc. which were fixed on slide glass react to the antibody of this invention, and is enforced by detecting the immune complex to generate using the sign second antibody. In this method, the amount of signs of the sign second antibody combined with this immune complex is measured.

[0038]

The ELISA method can be mentioned as a desirable example of the immunoassay using the antibody which recognizes said prostatic marker polypeptide. This ELISA method can be

enforced in accordance with techniques, such as the general competing method and a sandwich technique, and also a liquid phase system or a solid phase system can also enforce it.

The desirable embodiment of the ELISA method is as follows. First, a standard antigen (for example, the refined peptide concerned) is fixed and blocked in a suitable carrier. Subsequently, the sample containing the marker peptide in which detection is desired, and the antibody concerned are contacted to the above-mentioned fixed labelled antigen, and an antibody-immune complex and an antibody-standard antigen immune complex are made to generate competitively. The quantity of the generated antibody-immune complex can be measured and the mass of the polypeptide concerned in a sample can be determined from the analytical curve produced beforehand.

[0039]

The reactivity of the antibody of this invention and a standard antigen is known beforehand, and when an analytical curve etc. can be prepared, the sample containing the polypeptide concerned can also be fixed and used instead of said fixed standard antigen.

In the embodiment of the describing [above] ELISA method, using the antibody concerned as the first antibody, the sign of the second antibody to this first antibody can be carried out, and it can also be used. In this case, the quantity of an antibody-immune complex can be easily calculated by measuring the amount of signs of the sign second antibody combined with this.

Without using the second antibody which carried out the sign as a strange method of a described method, for example with an enzyme, the sign of the first antibody can be carried out and it can also be used. The sign of the first antibody may be carried out with biotin, and what combined the enzyme with ABISHIN or the SUTOREPU tor vicine instead of the second antibody may be used.

[0040]

(Preparation of the antibody of this invention)

As long as the antibody used by this invention recognizes and carries out the antigen-antibody reaction of the prostatic marker polypeptide of this invention, it may be any of a polyclonal antibody or a monoclonal antibody. Some the polypeptide and peptide used as the antigen used for manufacture of the antibody of this invention, or its fragment is following. :

- (1) Prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35;
- (2) Any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 to one or more amino acid residue substitution, Variation polypeptide which derives the antibody production to prostatic marker polypeptide which includes the amino acid sequence which varied by deletion, addition, and/or insertion, and includes any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35; it reaches.
- (3) It is the above (1) or a polypeptide fragment of (2), and is a polypeptide fragment which derives the antibody production to prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35.

[0041]

If the antibody production to prostatic marker polypeptide can be derived, this polypeptide fragment, Although there is no restriction in particular in the length, they are usually 15 amino

acid residue and a thing for which 25 amino acid residue is included especially at least preferably at least 20 amino acid residue at least. such polypeptides of (1) or (2) or (3) -- the peptide fragments can be used for antibody derivation as a constituent for antibody manufacture combining a desirable ingredient. The antibody used by this invention can be prepared by the following method.

[0042]

(Preparation of a monoclonal antibody)

First, a monoclonal-antibody-production cell can be created as follows. the above (1) of this invention, the polypeptide of (2), or (3) -- it is independent or a warm-blooded animal is medicated with the peptide fragments combining a carrier, a diluent, etc. In order to raise antibody production ability when prescribing a medicine for the patient, a complete Freund's adjuvant and an incomplete Freund's adjuvant may be prescribed for the patient. This administration is usually performed about a total of 2 to 10 times 1 time respectively every 2-6 weeks. When the example of the warm-blooded animal prescribed for the patient is given, there are an ape, a rabbit, a dog, a guinea pig, a mouse, a rat, a sheep, a goat, a fowl, etc., and especially a mouse and a rat are preferred.

[0043]

The individual in which antibody titer was accepted is chosen from the warm-blooded animal by which immunity was carried out with the antigen, for example, a mouse, when producing a monoclonal-antibody-production cell, and a spleen or lymph gland is extracted two to five days after the last immunity. And a monoclonal-antibody-production hybridoma can be prepared by uniting the antibody forming cell contained in the extracted organization with the myeloma cell of congener or heterozoic.

[0044]

Measurement of the antibody titer in antiserum can be performed by measuring the activity of the sign agent combined with the antibody, after, making labeling protein and antiserum which are mentioned later react for example. The method of known [operation / fusion], for example, a method of Kohler and Milstein It can carry out according to Nature (Nature), and [256, 495] (1975). When the example of a fusion accelerator is given, there are a polyethylene glycol (PEG), a Sendai virus, etc. and especially PEG is preferred.

[0045]

When the example of this myeloma cell is given, there is a myeloma cell of warm-blooded animals, such as NS-1, P3U1, SP2/0, and AP-1, and P3U1 is especially preferred.

The desirable ratio of the number of antibody forming cells (spleen cell) and the number of myeloma cells at the time of fusion is 1:1 to about 20:1. Cell fusion can be efficiently carried out, when it adds PEG1000-PEG6000 by about 10 to 80% of concentration preferably and 20-40 ** incubates for 1 to 10 minutes at 30-37 ** preferably, PEG and.

[0046]

Screening of the obtained monoclonal-antibody-production hybridoma can be performed by various methods. For example, the solid phase to which the antigen of prostatic marker

polypeptide was made to stick with direct or a carrier. Hybridoma culture supernatant liquid is added to (for example, a microplate), Next, the anti-immunoglobulin antibody which carried out the sign with a radioactive material, an enzyme, etc. (when the cell used for cell fusion is a mouse) An antimouse immunoglobulin antibody is used. Or protein A is added, How to detect the monoclonal antibody combined with solid phase; An anti-immunoglobulin antibody, Or hybridoma culture supernatant liquid is added to the solid phase to which protein A was made to stick, the marker polypeptide which carried out the sign with a radioactive material, an enzyme, etc. is added, and the method of detecting the monoclonal antibody combined with solid phase, etc. are mentioned.

[0047]

Sorting of a monoclonal antibody can be performed in accordance with a conventional method. Usually, it can carry out by the culture medium for animal cells which added HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine). As sorting and a culture medium for breedings, as long as it can grow a hybridoma, what kind of culture medium may be used. For example, 1 to 20% of fetal calf serum can use RPMI 1640 culture medium included 10 to 20% preferably, the GIT culture medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) containing 1 to 10% of fetal calf serum, or the serum free medium for hybridoma culture (SFM-101 and NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.).

[0048]

20-40 ** of culture temperature is usually about 37 ** preferably. Culture time is usually one week - two weeks preferably for five days - three weeks. Culture is usually performed under the wet environment of 5% of carbon dioxide. The antibody titer of hybridoma culture supernatant liquid can be measured like measurement of the antibody titer in the above-mentioned antiserum.

[0049]

Separation of a monoclonal antibody and refining can be performed in accordance with a conventional method. For example, a curing salting method usually used for separation of an immunoglobulin, and refining, an alcohol precipitation method, an isoelectric point sedimentation method, an electrophoresis method, and an ionic exchanger (an example.) It is a specific purification method etc. which extract only an antibody with activity adsorbent, such as the adsorption-and-desorption method by DEAE, an ultracentrifugal method, a gel-filtration method, a method by antigen joint solid phase and protein A, or the protein G, make combination dissociate, and obtain an antibody.

[0050]

(Preparation of a polyclonal antibody)

The polyclonal antibody of this invention can be manufactured in accordance with a conventional method. For example, the immunogen itself or the complex of the antigenic peptide fragments and career protein is built, It can manufacture by performing immunity to a warm-blooded animal like the manufacturing method of said monoclonal antibody, extracting the antibody inclusion to protein of this invention from this immune animal, and performing separation refinement of an antibody.

[0051]

When preparing the immune complex used for the immunity of a warm-blooded animal, the kind of career protein and the mixture ratio of this career protein and hapten will not be restricted in particular, if an antibody is efficiently produced to the hapten over which career protein was made to construct a bridge. For example, when bovine serum albumin, the cow thyroglobulin, or hemocyanin is used as career protein, it is preferred in these about 0.1-20 and to make a bridge construct at about one to 5 rate preferably to the hapten 1 at a weight ratio.

[0052]

Various condensing agents can be used for coupling of hapten and career protein. When the example of this condensing agent is given, there are an active ester reagent containing glutaraldehyde, a carbodiimide, maleimide active ester, a thiol group, and a JICHIOBIRIJIRU group, etc. The part in which an antibody production is possible is medicated with this condensation product with itself or a carrier, and a diluent to a warm-blooded animal.

[0053]

In order to raise antibody production ability when prescribing a medicine for the patient, a complete Freund's adjuvant and an incomplete Freund's adjuvant may be prescribed for the patient. Administration is usually performed about a total of about 3 to 10 times 1 time respectively every about 2-6 weeks. A polyclonal antibody is extractable from the blood of the warm-blooded animal by which immunity was carried out by said method, ascites, etc. Measurement of the polyclonal antibody value in antiserum can be performed like measurement of the antibody titer in the above-mentioned antiserum. Separation refinement of a polyclonal antibody can be performed according to separation of an immunoglobulin, and a purification method like the separation refinement of the above-mentioned monoclonal antibody.

[0054]

The kit for cancer diagnosis of this invention contains the polyclonal produced by doing in this way, or a monoclonal antibody. This kit for cancer diagnosis is applicable to diagnosis of a prostatic cancer by using at least one sort of antibodies which have singularity for prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35. This kit for cancer diagnosis can diagnose an androgen non-dependency prostatic cancer by using at least one sort for prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35 for the antibody which has singularity.

[0055]

This kit for diagnosis contains the well for immunoreaction, a stain, the enzyme labelled antibody for detection, a penetrant remover, an antibody diluent, a specimen diluted solution, an enzyme substrate, an enzyme substrate liquid diluent, and other reagents if needed.

Since the antibody which has singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 1-35 controls the manifestation of prostatic cancer specific protein, it is applicable to prevention of cancer-izing, advance delay, and a therapy. Especially the antibody that has singularity in prostatic marker polypeptide including any 1 amino acid sequence of the array numbers 18-35 can check androgen non-dependency acquisition of a

prostatic cancer, and can use it for advance delay of an androgen non-dependency prostatic cancer, and a therapy.

[0056]

Being able to prescribe in taking orally or parenterally for the patient the medicinal composition containing the antibody to said prostatic marker polypeptide of this invention, this parenteral administration includes local administration in an organization further.

Ingredients for pharmaceutical preparation, such as a carrier currently used widely when administering the medicinal composition of this invention orally, For example, a bulking agent, an extender, a binding material, disintegrator, a collapse depressant, a buffer, an isotonicizing agent, an emulsifier, a dispersing agent, a stabilizing agent, a coating agent, a surface-active agent, absorption enhancers, a moisturizer, a wetting agent, adsorbent, lubricant, an excipient, etc. can be used. Additive agents, such as colorant, a preservative, perfume, a flavor agent, and a sweetening agent, may be used if needed.

[0057]

When the concrete example of the ingredient for medicine manufacture is given, milk sugar, white soft sugar, sodium chloride, Grape sugar, urea, starch, calcium carbonate, kaolin, crystalline cellulose, Excipients, such as silicic acid, water, ethanol, simple syrup, grape sugar liquid, starch liquid, A gelatin solution, carboxymethyl cellulose, shellac, methyl cellulose, Binding materials, such as potassium phosphate and a polyvinyl pyrrolidone, dry starch, Sodium alginate, agar powder, the end of a laminaran, sodium bicarbonate, Calcium carbonate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, sodium lauryl sulfate, Disintegrator, such as stearic acid monoglyceride, starch, and milk sugar, white soft sugar, Collapse depressants, such as stearic acid, cacao butter, and hydrogenated oil, quarternary ammonium salt, It is lubricant, such as adsorbent, such as moisturizers, such as absorption enhancers, such as sodium lauryl sulfate, glycerin, and starch, starch, milk sugar, kaolin, bentonite, and colloid silicic acid, refining talc, and a stearate, etc. Furthermore, if needed, the art of a drug delivery system publicly known about each of above-mentioned dosage forms can be adopted, and gradual-release-izing, topical-application-izing (troches, buccal preparation, a sublingual tablet, etc.), drug release control, enteric-izing, stomach solubility-ization, etc. can be performed.

[0058]

When carrying out parenteral administration of the medicinal composition of this invention, it can be considered as gestalten, such as rectum administration by administration by injection of a drop by drop titration, an intravenous injection, subcutaneous injection, an intramuscular injection, etc., the suppositories made from fats and oils, water-soluble suppositories, and a suppository. This dispensing can be easily performed with a conventional method using the usual carrier in the medicine manufacture field.

The medicinal composition containing the antibody of this invention can be prescribed for the patient to the mammals (for example, a rat, a mouse, a guinea pig, a rabbit, a sheep, a swine, a cow, a horse, a cat, a dog, an ape, etc.) of Homo sapiens and others, for example. Although the dose of this antibody changes suitably by the target state, a route of administration, etc., For

example, when medicating an adult patient with a weight of 60 kg with the gestalt of injections, it is preferably preferred to prescribe about about 120-200 mg for the patient from a vein more preferably about about 100-250 mg about about 50-500 mg per day.

[0059]

By detecting at least one sort of the polynucleotide which encodes the prostatic marker polypeptide of this invention, i.e., polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, A test subject has a prostatic cancer or it can be judged whether you are the high-risk person of the. By detecting at least one sort of polynucleotide which includes any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70 especially, a test subject has an androgen non-dependency prostatic cancer, or it can be judged whether you are the high-risk person.

[0060]

In the diagnosing method of a prostatic cancer which detects the polynucleotide which encodes the prostatic marker polypeptide of this invention, the polynucleotide contained in the sample obtained from the test subject, for example, blood, a cell extract, a biopsy specimen, etc. is detected.

Detection of this polynucleotide the polynucleotide which encodes the prostatic marker polypeptide of this invention, . [whether it amplifies by a polymerase chain reaction method (PCR) using the synthetic DNA primer which has the partial sequence, and] Or the hybridization of what carried out the sign of the polynucleotide included in the suitable vector using the polynucleotide which encodes the part or all the fields of polypeptide of this invention, or a synthetic DNA can perform. The method of this hybridization can be performed to molecular cloning (5) by the method of a statement, etc., for example. this hybridization -- a high -- stringent conditions, for example, sodium concentration, are about 19 to 20 mM(s) especially about 19 to 40 mM, and it is preferred that temperature performs about 50-70 ** especially on the conditions which are about 60-65 **. The case where sodium concentration is [temperature] about 65 ** in about 19 mM(s) is the most preferred.

[0061]

In this invention, the nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis containing the following (i), (ii), or (iii) can be used.

- (i) Polynucleotide which has any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, and a complementary nucleotide sequence;
- (ii) nucleotide fragment; including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, and the partial sequence of a complementary nucleotide sequence -- or
- (iii) They are polynucleotide including any 1 nucleotide sequence of the array numbers 36-70, the polynucleotide hybridized under stringent conditions, or a nucleotide fragment.

[0062]

Especially the polynucleotide that has any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70 and a complementary nucleotide sequence can be used as a nucleic acid probe for androgen non-dependency cancer diagnosis.

When detecting the polynucleotide which encodes the prostatic marker polypeptide of this

invention by the PCR method, it can be performed with a conventional method.

In this PCR method, an antisense strand fragment is used as a reverse primer by making the sense strand fragment to any one sort of nucleotide sequences of the array numbers 36-70 into a forward primer.

The primer (forward primer) which consists of a nucleotide fragment which includes the partial sequence of any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70 especially, and any 1 nucleotide sequence of the array numbers 53-70, An androgen non-dependency prostatic cancer can be diagnosed by using the primer (reverse primer) which consists of a nucleotide fragment including the partial sequence of a complementary nucleotide sequence.

[0063]

Although it is usually 14 - 60bp although it is not necessary to restrict the length in particular of this forward primer, and it does not need to restrict the length in particular of a reverse primer, either, it is preferred to usually be referred to as 14 - 60pb.

When the kit for prostatic cancer diagnosis of this invention detects the prostatic marker polypeptide of this invention by hybridization, The polynucleotide which encodes any 1 the part or all the fields of a polypeptide sequence of the array numbers 36-70, or the thing which carried out the sign using the synthetic DNA is included as a nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis.

[0064]

This kit for prostatic cancer diagnosis aims at detection of an androgen non-dependency prostatic cancer, When hybridization detects this prostatic marker polypeptide, the polynucleotide which encodes any 1 the part or all the fields of a polypeptide sequence of the array numbers 53-70, or the thing which carried out the sign using the synthetic DNA is included as a nucleic acid probe for prostatic cancer diagnosis.

[0065]

The kit for prostatic cancer diagnosis of this invention contains an antisense strand fragment as a reverse primer by making the sense strand fragment to any one sort of nucleotide sequences of the array numbers 36-70 into a forward primer, when detecting the prostatic marker polypeptide of this invention by the PCR method. The kit for prostatic cancer diagnosis of this invention aims at detection of an androgen non-dependency prostatic cancer, When detecting prostatic marker polypeptide by the PCR method, an antisense strand fragment is included as a reverse primer by making the sense strand fragment to any one sort of nucleotide sequences of the array numbers 53-70 into a forward primer.

[0066]

. The prostatic marker polypeptide of this invention is the polynucleotide by which the code is carried out. It can manufacture by including the polynucleotide which has a nucleotide sequence of the array numbers 36-70 in a suitable expression vector, and transforming a suitable host by this expression vector, and proliferating this host.

[0067]

The expression vector of the prostatic marker polypeptide of this invention can cut down the

DNA fragment made into the purpose from the polynucleotide which encodes this polypeptide, and can manufacture it by connecting this DNA fragment downstream from the promotor in a suitable vector.

The plasmid of Escherichia coli origin to the vector used here (an example, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), The plasmid of bacillus subtilis origin (an example, pUB110, pTP5, pC194). There are animal viruses, such as bacteriophages, such as a yeast origin plasmid (an example, pSH19, pSH15) and lambda phage, a retrovirus, a vaccinia virus, and a baculovirus, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo, etc.

[0068]

As long as the promotor who uses by this invention is a suitable promotor corresponding to the host who uses it, what kind of thing may be satisfactory for him. For example, when using an animal cell as a host, there are SRalpha promotor, an SV40 promotor, an LTR promotor, a CMV promotor, a HSV-TK promotor, etc. When these hosts are microorganisms of the genus Escherichia, a trp promotor, a lac promotor, There are a recA promotor, lambdaPL promotor, a lpp promotor, T7 promotor, etc., and when this host is the genus Bacillus, When this host is yeast, SPO1 promotor, SPO2 promotor, a penP promotor, etc., There are PHO5 promotor, a PGK promotor, a GAP promotor, an ADH promotor, etc., and when this host is an insect cell further, they are a polyhedrin promotor, P10 promotor, etc.

[0069]

What contains an enhancer, a splicing signal, a poly A addition signal, a selective marker, an SV40 duplicate origin, etc. by request further can be used for the expression vector of this invention. As this selective marker, there are a dihydrofolate reductase gene, an ampicillin resistance gene, a neomycin resistance gene, etc., for example. A signal sequence suitable for a host is added to the N terminal side of the polypeptide of this invention if needed. When these hosts are microorganisms of the genus Escherichia, when this host is the genus Bacillus, a PhoA signal sequence, an OmpA signal sequence, etc., When this host is yeast, an alpha-amylase signal sequence, a subtilisin signal sequence, etc., MFalpha signal sequence, SUC2, a signal sequence, etc. can use an insulin signal sequence, alpha-interferon signal sequence, an antibody molecule signal sequence, etc., when this host is an animal cell. A transformant can be manufactured using the vector containing DNA which encodes the polypeptide of this invention built in this way.

[0070]

The host who uses by this invention has microorganisms of the genus Escherichia, the genus Bacillus, yeast, an insect cell, an insect, an animal cell, etc., for example. In order to transform this genus Bacillus, there is the method of a statement in molecular and general FTgenetics (Molecular & General Genetics), 168 volumes, 111 (1979), etc., for example. In order to transform yeast, for example Methods in Enzymology (Methods in Enzymology), There are methods, such as 194 volumes, 182-187 (1991), the pro SHIJINGUZU OBU the National Academy of Sciences OBU the U.S.A. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 volumes, and 1929 (1978). In order to transform an insect cell or an insect, there is the method of a statement in

biotechnology/technology (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988), etc., for example. In order to transform an animal cell, cell technology separate volume 8 new cell technology experiment protocol .263-267 (1995) (Shujunsha issue), Virology (Virology), 52 volumes, and 456 (1973) have the method of a statement, for example. Thus, the transformant transformed by the expression vector containing DNA which encodes the polypeptide of this invention is producible.

[0071]

The carbon source which a liquid medium is suitable and needs it for growth of this transformant in it as a culture medium used for culture when this host cultivates the transformant which are microorganisms of the genus Escherichia and the genus Bacillus, a nitrogen source, and an inorganic substance and others are *****S. As a carbon source, here, for example as a nitrogen source, glucose, dextrin, soluble starch, sucrose, etc., For example, as a part for autotrophy, a calcium chloride, a sodium dihydrogenphosphate, a magnesium chloride, etc. have ammonium salt, nitrates, corn steep liquor, peptone, casein, a meat extract, soybean cake, potato extract, etc., for example. A yeast extract, vitamins, a growth promoter, etc. may be added. As for pH of a culture medium, about 5-8 is desirable.

[0072]

M9 culture medium which contains glucose and casamino acids as a culture medium which cultivates microorganisms of the genus Escherichia, for example [Mirror (Miller), journal OBU EKUSU peri face yne molecular FTgenetics (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, and New York1972] are preferred.

In order to work a promotor efficiently, drugs like 3beta-indolyl acrylic acid can be added, for example. When hosts are microorganisms of the genus Escherichia, culture can usually be performed at about 15-43 ** for about 3 to 24 hours, and aeration and churning can also be added as occasion demands. When a host is the genus Bacillus, culture can usually be performed at about 30-40 ** for about 6 to 24 hours, and aeration and churning can also be added as occasion demands.

[0073]

As a culture medium in which a host cultivates the transformant which is yeast, it is the Burkholder (Burkholder) minimal medium, for example. [Bostian, K. L. et al., the pro SHIJINGUZU OBU the National Academy of Sciences OBU the U.S.A. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 volumes, 4505 (1980)] SD culture medium containing 0.5% of ** casamino acids There are [Bitter, G.A. et al., the pro SHIJINGUZU OBU the National Academy of Sciences OBU the U.S.A. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 volumes, and 5330 (1984)]. As for pH of this culture medium, adjusting to about 5-8 is preferred. Culture is usually performed at about 20 ** - 35 ** for about 24 to 72 hours, and aeration and churning are added if needed.

[0074]

When a host cultivates the transformant which is an insect cell, the double ground etc. which added additives, such as 10% bovine serum which carried out decomplementation to the grace insect culture medium (Grace's Insect Medium: Grace, T.C.C., Nature, 195,788 (1962)), are

used. As for pH of this culture medium, adjusting to about 6.2-6.4 is preferred. Culture is usually performed for about three to five days at about 27 **, and aeration and churning are added if needed.

[0075]

The MEM culture medium which contains about 5 to 20% of new-born calf serum as a culture medium, for example when a host cultivates the transformant which is an animal cell [Science (Science), 122 volumes, 501 (1952)] DMEM culture medium [Virology (Virology), eight volumes, 396 (1959)] RPMI 1640 culture medium [199 journal OBU the American medical associations (The Journal of the American Medical Association), 519 (1967)] 199 culture media [Proceeding of the Society for the Biological Medicine (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 volumes, 1 (1950)] **** is used. As for pH, it is preferred that it is about 6-8. Culture is usually performed at about 30 ** - 40 ** for about 15 to 60 hours, and aeration and churning are added if needed. Thus, the polypeptide of this invention can be made to produce out of intracellular [of a transformant], a cell membrane, or a cell.

[0076]

A conventional method is followed in order to carry out separation refinement of the polypeptide of this invention from the above-mentioned culture. For example, the polypeptide of this invention is faced extracting from a culture object and a cell, After collecting a biomass or cells by a publicly known method after culture, suspending this to suitable buffer solution and destroying a biomass or a cell by the ultrasonic wave, a lysozyme, freeze thawing, etc., it is the method of obtaining the crude extract of polypeptide by centrifugal separation or filtration etc. Denaturing agents, such as urea and guanidine hydrochloride, and surface-active agents, such as triton X-100TM, may be contained in this buffer solution. When polypeptide is secreted in culture medium, a biomass or a cell, and supernatant liquid are separated by a publicly known method after the end of culture, and supernatant liquid is collected. Thus, refining of the obtained culture supernatant or the polypeptide contained in an extract is performed, combining suitably publicly known separation and purification method. How to use solubility, such as curing salting and a solvent precipitation method, as publicly known these separation and purification methods. Methods of mainly using the difference of a molecular weight, such as dialysis, ultrafiltration, a gel-filtration method, and an SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis method, There are a method of using the difference of isoelectric points, such as a method, isoelectric focusing, etc. using hydrophobic differences, such as a method, reversed phase high pressure liquid chromatography, etc. using specific compatibility using the difference of electrifications, such as ion exchange chromatography, such as a method and affinity chromatography, etc.

[0077]

the method that it is publicly known when this polypeptide is obtained by educt -- it is convertible for a salt, and when conversely obtained with a salt, it can change into educt or other salts by a publicly known method. When refining front stirrups make protein repair enzyme suitable after refining the polypeptide which recombinant produces act, ornamentation can be added arbitrarily or polypeptide can also be removed selectively. As protein repair enzyme, there

are trypsin, chymotrypsin, arginyl proteinase, protein kinase, glycosidase, etc., for example. Thus, the polypeptide of generated this invention can be checked by enzyme immunoassay, Western blotting, etc. which used the specific antibody.

[Work example 1]

[0078]

Extraction of the polypeptide sample from a prostate cancer cell line

The Homo sapiens prostate cancer cell line LNCaP which came to hand from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) was used as a sampling which searches prostatic marker polypeptide. The LNCaP cell was cultured at 37 °C under CO₂5% wet environment all over the RPMI time ground (Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI) containing 10% of foetal calf serum. The LNCaP cell was transplanted to male nude-mouse (BALB/c strain) purchased from Japanese SLC (Shizuoka, Japan) in this example.

[0079]

First, the LNCaP cell 1x10⁷ individual was mixed in Matrigel 0.1 ml (Matrigel: Becton Dickinson Labware, NJ, USA), and this mixture was transplanted to the regions-of-back hypodermic of a male nude mouse. The extirpation of the testis was carried out in the place where the cancer tissue became 200 mm³ from 100. Although the cancer tissue was reduced primarily, repopulation was begun soon. It extracted in the place where this cancer reached 200 to 400 mm³. Cancer which carried out repopulation of the cancer extracted before the testis extirpation after androgen dependency (Androgen Dependent; AD) and a testis extirpation was made into androgen non-dependency (Androgen Independent; A.I. Artificial Intelligence).

[Work example 2]

[0080]

Production of a cancer marker polypeptide distribution map

After carrying out the cancer cell obtained in Example 1ize [HOMOJU] by the protein extract of weight 20 times and carrying out ultracentrifuge, the obtained supernatant liquid was used for the proteome analysis. This invention persons carried out this proteome analysis combining the tandem-mass-spectrometry method (MS/MS) to agarose two dimensional electrophoresis.

[0081]

Agarose two dimensional electrophoresis was performed by the publicly known method which applied agarose to isoelectric focusing of the one-dimensional eye (2). Namely, said 100micro of extracts l (equivalent to 1 mg of protein) were put on the agarose gel upper bed of diameter 3.4 mm and length 180 mm, and the electric charge of 700 v was applied for 20 hours. Then, this gel is placed on SDS-PAGE gel (uniform 12% gel and 6-10% concentration gradient gel) of 195x120 mm, SDS sample buffer (SDS2%, glycerol 10%, and 2-mercaptoethanol 5% and bromophenyl blue 0.02%, the 0.05M tris- HCl, and pH 6.5) was passed from the upper part, and it migrated by 60 mA. Gel was dyed by KUMA G Brilliant Blue R-350 (Coomasie Brilliant Blue R-350) after the end of migration.

[0082]

Identification of a total of 324 protein spots on the agarose two-dimensional-electrophoresis gel

of a prostatic cancer was advanced, 303 spots were numbered except for the spot duplicate between gels, and the two-dimensional-electrophoresis gel map was created. The number was given to uniform 12% gel with emphasis on an inside low molecule protein region to 108 pieces (drawing 1) and 195 spots (drawing 2) from 6-10% concentration gradient gel with emphasis on a polymers protein region. Then, a total of 233 protein was able to be identified from these spots. [0083]

Drawing 1 and 2 are maps originating in the androgen non-dependency prostate cancer cells of Example 1 in which distribution of cancer marker polypeptide is shown. The obtained two-dimensional-electrophoresis gel is downloaded to a computer as a graphics file after desiccation, Quantitative analysis of the protein spot was conducted using image-analysis software (Phoretix 2D Advanced Version 5.01 : Nonlinear DynamicsLtd, UK).

[Work example 3]

[0084]

The spot of the two-dimensional-electrophoresis gel obtained in Example 2 was identified by the publicly known fluid chromatogram tandem-mass-spectrometry method (liquid chromatography-mass spectrometry/MS). That is, the spot on gel was started, and after digesting protein in gel with trypsin, the quantity equivalent to about 15 pmol(s) was applied to liquid chromatography-mass spectrometry/MS. The mass data of the peptide fragments obtained from here were analyzed using analysis software (SEQUEST), and the protein contained in the spot on said gel by the database of the U.S. NCBI was identified. A proteinic amino acid sequence and base sequence were also depended on the NCBI database. Proteome-analysis software (SEQUEST) can be obtained by the following URL now on September 1, 2003.

[0085]

URL: <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>

The URL of a NCBI database is as follows.

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>

When all the 233 protein identified in said NCBI database was searched using MedLine, 35 protein in which relevance with a prostatic cancer is not reported until now is contained, namely, new prostatic cancer marker polypeptide was found out.

[0086]

The protein identified here is enumerated by the paragraph of the mode of operation of this specification. The number given to each protein is in agreement with the amino acid sequence number of the array table attached to this specification.

[Work example 4]

[0087]

Sorting of androgen non-dependency prostatic cancer marker polypeptide

Two-dimensional-electrophoresis gel is downloaded to a computer as a graphics file after desiccation, Quantitative analysis of the protein spot was conducted using image-analysis software Phoretix 2D Advanced Version 5.01 (Nonlinear Dynamics Ltd, UK). Phoretix 2D Advanced Version 5.01 compared individually the protein spot of the two-dimensional-

electrophoresis gel of androgen dependence group 5 sample and non-depending group 5 sample in fixed quantity, and the expression amount of each spot in 2 being between groups was statistically authorized by the T-test.

[0088]

When the comparative examination of the proteinic manifestation was statistically carried out by the androgen dependence group and the non-depending group, six protein in which 12 protein which increased by the non-depending group in $p < 0.1$ among the prostatic marker polypeptides found out in Example 3 decreased in number was accepted. Similarly, in $p < 0.05$, four protein in which seven protein which increased decreased in number was accepted.

[0089]

The fixed-quantity comparison graph was indicated to be the protein spot which showed drawing 3 quantitative increase and decrease with statistically significant difference ($p < 0.05$) with androgen non-dependency acquisition of a prostatic cancer. In drawing 3, AD shows a protein spot particular number [in / A.I. Artificial Intelligence / group / androgen dependence / for androgen a non-depending group / in PN / drawing 1 and 2] (Protein-identification number). This PN is a specific number of the protein spot used in the example, and is not in agreement with the array number of the array table of this specification.

[0090]

When the gel of each group examined bibliographically also including the polypeptide as which increase and decrease were regarded macroscopically, there were 17 things to which relation with a prostatic cancer is not reported conventionally (drawing 3). These are polypeptides including the amino acid sequence of the array numbers 18-36 indicated in the array table. Polypeptide including the amino acid sequence of the array numbers 18-28 the zymogram of these polypeptides as a result of analysis, As for the polypeptide which an expression amount increases when a prostatic cancer acquires an androgen non-dependency, and includes the amino acid sequence of the array numbers 29-36, it became clear that an expression amount decreases.

[Work example 5]

[0091]

The manifestation of the prostatic marker polypeptide in the Homo sapiens prostatic cancer The manifestation of said prostatic marker polypeptide in the Homo sapiens prostatic cancer was checked by the western blotting using an antibody.

(Preparation of the Homo sapiens prostatic cancer sample)

The human prostate cancer tissue used by this example and normal prostatic glandular tissue acquired and extracted consent by the Kitasato University Hospital urology department in Sagamihara-shi, Kanagawa from the patient who underwent the operation. A patient's details are as follows.

[0092]

1. NP1: normal prostatic glandular tissue : normal prostatic glandular tissue was extracted from the prostate gland by which the merger extirpation was carried out in a 51 years-old male and vesical cancer.

2. P8: normal prostatic glandular tissue : the prostate gland full extraction was enforced in a 70 years-old male and a prostatic cancer. Normal prostatic glandular tissue was extracted from the noncancerous part.
3. P3: normal prostatic glandular tissue : normal prostatic glandular tissue was extracted from the prostate gland by which the merger extirpation was carried out in a 60 years-old male and vesical cancer.
4. P5: prostate-cancer-tissue (androgen dependency): -- the prostate gland full extraction was enforced in a 50 years-old male and a prostatic cancer. Prostate cancer tissue was macroscopically extracted from the cancer part.
5. P1: prostate-cancer-tissue (androgen non-dependency): -- since it recurred in an 80 years-old male and a prostatic cancer after trying an androgen ablative therapy, and it became the ischuria, transurethral prostatectomy was enforced. An excision organization has an androgen non-dependency prostatic cancer, and extracted this.

[0093]

6. CaP5: prostate-cancer-tissue (androgen non-dependency): -- a 64 years-old male and a prostatic cancer sake -- before an operation [for six months] -- after enforcing an androgen ablative therapy, the prostate gland full extraction was enforced. Prostate cancer tissue was macroscopically extracted from the cancer part.

Ize [of the obtained cancer tissue / HOMOJU] was carried out by the protein extract of weight 20 times, and it inquired using the supernatant liquid after ultracentrifuge.

First, the protein concentration of the cancer extract of a LNCaP mouse inoculation model and said Homo sapiens prostatic glandular tissue extract is quantified by the publicly known Bradford method, It diluted with SDS sample buffer (SDS2%, glycerol 10%, and 2-mercaptoethanol 5% and bromophenyl blue 0.02%, the 0.05M tris- HCl, pH 6.5), and prepared [ml] in 2mg /. This was incubated for 15 minutes at 97 **, and the sample was prepared.

[0094]

Electrophoresis of this sample was carried out 12.5% with an every [1] of 10micro each by SDS-PAGE gel. Protein of this gel was transferred on the PVDF film. Blocked this with the gelatin solution 3%, it was made to react with the primary antibody solution of the protein concerned, and the second antibody of the alkaline phosphatase sign was made to react.
(Prostatic marker polypeptide and antibody)

The used primary antibody is as follows.

Prostatic-marker polypeptide including the amino acid sequence of the array number 3 (Rad50):
A commercial anti human RAD50 rabbit polyclonal antibody (AB3754, Chemicon International, Inc., CA, USA)

Prostatic-marker polypeptide including the amino acid sequence of array-number 11. (Mop-4): A commercial anti human MOP4 rabbit polyclonal antibody (AB5442P, Chemicon International, Inc., CA, USA)

Prostatic-marker polypeptide including the amino acid sequence of the array number 14 (VDAC-1): A commercial anti human VDAC-1 goat polyclonal antibody (sc-8828, Santa Cruz

Biotechnology, Inc., CA, USA)

Prostatic marker polypeptide including the amino acid sequence of the array number 19 (LON protease) : The polypeptide fragment (array number 71) of the amino acid sequence of the array number 19 is compounded, The blood serum was extracted after 8 times inoculation to the hypodermic of the rabbit combining career protein, and this blood serum was used as a primary antibody.

[0095]

Polypeptide fragment CFDIAFPDEQAEALAVER (array number: 71)

Prostatic marker polypeptide including the amino acid sequence of the array number 21 (EBNA-2 co-activator; p100) : The polypeptide fragment (array number 72) of the amino acid sequence of the array number 21 is compounded, The blood serum was extracted after 8 times inoculation to the hypodermic of the rabbit combining career protein, and this blood serum was used as a primary antibody.

[0096]

Polypeptide fragment RPASPATETVPAFSERTC (array number: 72)

The amino acid sequence of the array number 30. Included prostatic marker polypeptide (Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein) : The polypeptide fragment (array number 73) of the amino acid sequence of the array number 30 is compounded, The blood serum was extracted after 8 times inoculation to the hypodermic of the rabbit combining career protein, and this blood serum was used as a primary antibody.

[0097]

Polypeptide fragment CRMQAQWEREERERLEIAR (array number: 73)

The amino acid sequence of the array number 33. included prostatic marker polypeptide (Ubiquitin-activating enzyme E1) : -- commercial anti human Ubiquitin-activating enzyme E1 mouse monoclonal nature antibody (MAB3520.) Chemicon International, Inc., CA, USA)

The used second antibody is as follows, and was purchased and used.

[0098]

Anti-mouse IgG (alkaline phosphatase sign) (115-055-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA)

Anti-rabbit IgG (alkaline phosphatase sign) (172-1016, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

Anti-goat IgG (alkaline phosphatase sign) (AP-5000, Vector Laboratories, Inc., CA, USA)
(Result)

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (Rad50) including the amino acid sequence of the array number 3 :

Although the manifestation in which Rad50 is strong at normal prostatic glandular tissue was accepted, the manifestation was decreasing in prostate cancer tissue (drawing 4).

[0099]

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (Mop-4) including the amino acid sequence of array number 11. :

Although the manifestation in which Mop-4 is strong at normal prostatic glandular tissue was

accepted, the manifestation was decreasing in prostate cancer tissue (drawing 5).

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (VDAC-1) including the amino acid sequence of the array number 14 :

VDAC-1 had few manifestations at normal prostatic glandular tissue, and the manifestation was increasing in prostate cancer tissue (drawing 6).

[0100]

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (LON protease) including the amino acid sequence of the array number 19 :

LON protease had few manifestations at normal prostatic glandular tissue, and the manifestation was increasing in prostate cancer tissue. Compared with the androgen dependence group, the manifestation was increasing by the non-depending group (drawing 7).

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (EBNA-2 co-activator; p100) including the amino acid sequence of the array number 21 :

EBNA-2 co-activator; Although the manifestation in which p100 is strong at normal prostatic glandular tissue was accepted, the manifestation was decreasing in prostate cancer tissue.

Compared with the androgen dependence group, the manifestation was increasing by the non-depending group (drawing 8).

[0101]

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein) including the amino acid sequence of the array number 30 : This marker polypeptide had few manifestations at normal prostatic glandular tissue, and the manifestation was increasing it with prostate cancer tissue. Compared with the androgen dependence group, the manifestation was decreasing by the non-depending group (drawing 9).

[0102]

Detection result by the antibody of prostatic marker polypeptide (Ubiquitin-activating enzyme E1) including the amino acid sequence of the array number 33 :

Ubiquitin-activating enzyme E1 had few manifestations at normal prostatic glandular tissue, and the manifestation was increasing in prostate cancer tissue. Compared with the androgen dependence group, the manifestation was decreasing by the non-depending group (drawing 10).

[Work example 6]

[0103]

Analysis by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The mRNA expression level of the array numbers 53-70 in the Homo sapiens prostatic cancer of an androgen dependency and an androgen non-dependency which encodes prostatic marker polypeptide can be analyzed as follows using RT-PC.

First, extraction of mRNA in prostatic glandular tissue is performed along with a manufacturer's specifications using an ISOGEN RNA separation kit (ISOGEN RNA isolation kit and ISOGEN). Therefore, RT-PCR is performed to a publicly known method using TAKARA RNA LA PCR kit Ver. 1.1 (Takara RNA LA PCR kit Ver. 1.1, TAKARA brewing, Otsu) (6).

[0104]

That is, 1st chain cDNA compounds the total RNA (1.5microg) as a template. A random hexamer (Random hexamer, 50 pM) by the reaction mixture containing 5 mM MgCl₂, 1x RNA PCR buffer solution, 10 mM dNTP mix, and 20 U ribonuclease inhibitor 30 ** 10 minutes, and 55 ** 15 minutes, 99 ** incubates for 5 minutes. After diluting so that it may be set to 40microl with distilled water, to 5microl of them 2.5 U Tag polymerase (TAKARA brewing), 1.5 mM MgCl₂, 1 x RNA PCR buffer solution, and 10 mM dNTP mix -- and, a forward primer and each reverse primer -- 20 pM is added and 35 cycles are amplified using DNA thermal cycler (ASTEC, Fukuoka). Agarose gel electrophoresis analyzes an PCR product 3%. A computer determines the optimal arrangement of the set of the primer/probe used for this analysis.

[0105]

The array number of the array table of this specification shows the arrangement explained below. A relation with a prostatic cancer is not known until now, and, as for the polypeptide which has an amino acid sequence of the array numbers 1-35, a relation with a prostatic cancer will not be known without this invention persons. The polynucleotide of the array numbers 36-70 is mRNA or DNA which encodes any 1 polypeptide of the array numbers 1-35. The cable address "NCBI" in the following explanation means database National Center for Biotechnology Information, and "PN" means the number of the spot in drawing 1 and the zymogram of 2.

[0106]

(Array number: One) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of KIAA0336 gene product. This gene product is seen in a brain cDNA library, and participating in signal transfer, nucleic acid regulation, and a cell ossification center is reported from the motif database. NCBI Accession No.7662062, PN:029

(Array number: Two) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of the gene product considered to be TAR RNA-interaction protein (TRIP TAR RNA-interacting protein, TRIP) or TRIP polypeptide. It is reported that mRNA is high-revealed by the embryo heart. Reed (1998) dissociates from an ovarian cancer cDNA library, and by MS, since it is 160kD in SDS-PAGE but 83 kD, it is thought that dimer formation is carried out (Wilson, 1998). NCBI Accession No.4758690, PN:041

(Array number: Three) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is RAD50. It is also an amino acid sequence of a homologue (RAD50 homolog: S.cerevisiae). It is reported that this homologue carries out inactivation of tumorous protein (oncoprotein) of adenovirus and the RAD50-MRE11-NBS1 complex, and demonstrates carcinogenicity.

NCBI Accession No.19924129, PN:045

[0107]

(Array number: Four) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of virtual polypeptide FLJ10839. Since there was an SAP motif, it seemed that it has a DNA binding part, but the

function was unknown until now.

NCBI Accession No.20471264, PN:049

(Array number: Five) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of a wealth leucine PPR-motif inclusion (Leucine-rich PPR-motif containing) gene product. This gene product is highly-revealed by cDNA of a liver blastoma, and it is thought that it is participating in a cytoskeleton, intracellular transport, transfer, and core cytoplasm closing by functional presumption from the amino acid sequence.

NCBI Accession No.18959202, PN:054

[0108]

(Array number: Six) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of RNA helicase KIAA0801 (RNA helicase KIAA0801). NCBI Accession No.7662318, PN:057.2

(Array number: Seven) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of ubiquitin singularity protease 7 (Ubiquitin specific protease 7). It is reported that this protease 7 is cancer control protein with which the growth inhibition which stabilizes P53 gene and passes p53, and apoptosis are assisted.

NCBI Accession No.4507857, PN:058

[0109]

(Array number: Eight) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of calcium (ca2+) homeostasis endoplasm reticulum protein (Calcium (ca2+) homeostasis endoplasmic reticulum protein). A manifestation is checked from a brain cDNA library or a Homo sapiens erythroleukemia (HEL) cell cDNA expression library, this protein works to the homeostasis of Ca2+, and it is reported that it is related to the differential growth.

NCBI Accession No.18204653, PN:061

[0110]

(Array number: Nine) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of MGC21133 protein (Nucleoporin 133kDa, Protein for MGC21133). This protein is revealed by a melanoma cell and there is a report of bearing extranuclear transportation of mRNA. NCBI Accession No.18043079, PN:065

(Array number: Ten) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of the gene product considered to be RNA helicase related protein (RNA helicase-related protein) or its related polypeptide. This gene product is checked in the Homo sapiens pancreatic islet cDNA library, and is considered to be a dead box polypeptide family (DEAD box proteinfamily). NCBI Accession No.11267525, PN:069

[0111]

(Array number: 11) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of MOP-4. This MOP-4 is revealed to a human monocyte and making ubiquitin, combination, and a cascade start in the 1st step of the protein breakdown in a ubiquitin proteasome system is reported. NCBI Accession No.11990422, PN:070

(Array number: 12) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of an insulin degradation enzyme (Insulin-degrading enzyme). This enzyme has an insulin, glucagon, and the activity that decomposes beta amyloid. In an Alzheimer disease, although there is no change in the production amount to the inside of the **** cerebrospinal fluid of beta amyloid, since beta amyloid deposits in a brain, reduction of this enzyme is called cause.

NCBI Accession No.20548083, PN:091

[0112]

(Array number: 13) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement, The MCM5 minichromosome maintenance defect 5, the cell fractionation cycle 46 (MCM5 minichromosome maintenance deficient 5 and cell division cycle 46 (S)). It is also an amino acid sequence of a cerevisiae gene product. Revealing this gene product by a Burkitt lymphoma is reported. NCBI Accession No.13177775, PN:0102

(Array number: 14) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of voltage dependency anion selector-channel protein 1 (Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)). It is reported that this protein participates in the apoptosis regulation of BCL-2 family.

NCBI Accession No.130683, PN:231

[0113]

(Array number: 15) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of pro HIBICHIN (Prohibitin). A possibility that pro HIBICHIN will participate in the onset of a breast cancer by DNA synthesis inhibition and variation of PHB is reported.

NCBI Accession No.464371, PN:244.2

(Array number: 16) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of nip snap 1 protein (NipSnap1 protein). This protein is similar to the gene product of *C. elegans* (*C. elegans*) chromosome III, and it is reported that it is related to intracellular organelle movement. NCBI Accession No.17380144, PN:258

(Array number: 17) The amino acid sequence of the prostatic marker polypeptide of this invention is shown. This arrangement is also an amino acid sequence of PEROKISHIREDOKEISHIN 4 (Peroxiredoxin 4). It is reported that this protein is participating in transfer of cytokine or an immune system.

NCBI Accession No.3024727, PN:259

[0114]

(Array number: 18) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of splicing coactivator subunit SRM300 (Splicing coactivator subunit SRM300). this subunit SRM300 -- RNA unity polypeptide -- and

It is known as a AT-wealth element bonding factor etc. It meets with SRM160 and precursive mmr, and exists in a core speckle, and participating in reconstruction of an SRM160/SRM300 DEPURITOSUPU lysin reaction is reported. NCBI Accession No.19923466, PN:002

(Array number: 19) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of a ROMPUROTE ase homologue (Lon protease homolog). It is reported that an SOS gene cluster is derived at the time of DNA damage, and this homologue works to the restoration.

NCBI Accession No.12644239, PN:092.2

[0115]

(Array number: 20) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of puromycin susceptibility aminopeptidase (Puromycin-sensitive aminopeptidase). This peptidase is protease required for activation, cell growth, and diversity of a neuropeptide, and increasing, if it is identified from the cDNA library of an embryo brain and stimulates by vitamin D by a leukemic cell is reported. NCBI Accession No.2499902, PN:099

(Array number: 21) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is EBNA-2. It is also an amino acid sequence of a coactivator (EBNA-2 co-activator (100kD)). EBNA-2 A coactivator activates translation of a specific gene, and is indispensable to transfer of an EBV-related B cell, and participating in the melanin synthesis of drosophila further is reported.

NCBI Accession No.7657431, PN:116, 088

[0116]

(Array number: 22) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of a different-species nucleic acid ribonucleic polypeptide D Mr. homologue (JKTBP). Participating in splicing of RNA and movement is reported about this homologue.

NCBI Accession Nos.7446333, 4512253, PN:223

[0117]

(Array number: 23) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of a GTP-unity protein beta chain homologue (GTP-binding protein beta chain homolog). This homologue is known as a GTP-unity polypeptide beta chain homologue, HMC B compound polypeptide 12.3, etc., It is reported that it is similar with the receptor of rat RACK1 (Rn.2568) which is a lymphocyte activation function and an insulinlike growth factor (IGF-1) etc.

NCBI Accession No.5174447, PN:233, 237

[0118]

(Array number: 24) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of a core and chlorine ion channel protein (Nuclear chloride ion channel protein). NCBI Accession No.2073569, PN:243

(Array number: 25) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of William BEUREN syndrome chromosome region 1 homologue (William-Beuren syndrome chromosome region 1 homolog). This homologue is Wbscr1. It is known as a substitution splice product, William-Beuren syndrome chromosome region 1 homologue, etc., and the function which stimulates the start of polypeptide synthesis on the level of mRNA use is reported.

NCBI Accession No.18204592, PN:251

[0119]

(Array number: 26) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of antioxidant protein 2 (Antioxidant protein 2). This protein reduces hydrogen peroxide in relation to redox control of a cell, and reduces short chain organic fatty acids and a phospholipid peroxide, and the role in the metabolic regulation of phospholipid and the defense to an oxidation obstacle is reported. NCBI Accession Nos.1718024, 4758638, PN:266

(Array number: 27) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of peroxy

REDOKUSHIN 1 (Peroxiredoxin 1). Peroxy REDOKUSHIN. 1 has controlled signal transfer of a growth factor and TNFalpha by adjusting intracellular hydrogen peroxide. Appearing under oxidant stress is reported.

NCBI Accession No.548453, PN:284

[0120]

(Array number: 28) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will raise this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the Coffey Lynne non-muscular isoform (Cofilin, non-muscle isoform) (18 kDa phosphorus polypeptide) 1. When this isoform combines with actin, and helps movement in a core from the cytoplasm and it is phosphorylated by LIM-kinase, carrying out depolymerization of the actin is reported. NCBI Accession No.116848, PN:297

(Array number: 29) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of KURUPPERU type zinc finger protein (Kruppel-type zinc finger protein, PEG3). It is high-revealed in an adult brain, and since it will carry out carcinogenicity disappearance if transfection of this protein is carried out to a glioma cell, it is considered to be tumor control polypeptide.

NCBI Accession No.11494024, PN:028

[0121]

(Array number: 30) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the SUKAFU fold ATTATCHIMENTO factor B or HSP27 ERE-TATA-unity protein (Scaffold attachment factor B, HSP27 ERE-TATA-binding protein). This protein is HSP27 promotor joint protein, and it is revealed within the core of the cell line of various breast cancers, and it is considered to be a gene-of-cause candidate of a breast cancer. NCBI Accession No.21264343, PN:043

(Array number: 31) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the SUPURAISOZOMU related protein 130 (Splicosome-associated protein 130). This protein is known as the splicing factor 3b, the subunit 3 (130kDa), the spliceosome meeting polypeptide 130, etc., and it is reported that it is a component of complex SF3b which functions in a spliceosome.

NCBI Accession No.11034823, PN:059

[0122]

(Array number: 32) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the squamous cell carcinoma antigen 3 (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3, SART3) recognized by a T cell. It is reported this antigen deriving a tumor specificity T cell, and working to tumor immunity, and participating also in mRNA splicing and that it is not revealed by colon cancer in a manifestation and normal tissue.

NCBI Accession No.7661952, PN:062

[0123]

(Array number: 33) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the ubiquitin activation enzyme E1 (Ubiquitin-activating enzyme E1). It is reported that the ubiquitin activation enzyme E1 makes ubiquitin, combination, and a cascade start in the 1st step of the protein breakdown in a ubiquitin proteasome system.

NCBI Accession No.4507763, PN:074.2, 078

[0124]

(Array number: 34) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is also an amino acid sequence of the KARIOFERIN (karyopherin) beta 1 or the impotence rutin (importin) beta 1. This gene product is combined with protein with an intranuclear signal, this protein is conveyed into a core from cytoplasm, and ending transportation is reported by combining with RAN. NCBI Accession No.19923142, PN:103

(Array number: 35) It is an amino acid sequence of the polypeptide which serves as an androgen dependency prostatic cancer marker of this invention, and an androgen non-dependency prostatic cancer marker. A prostatic cancer's acquisition of an androgen non-dependency will reduce this cancer marker's manifestation. This arrangement is ha1225. It is also an amino acid sequence of a gene product (The ha1225 gene product). It is reported that this gene product relates to the Homo sapiens alpha-glucosidase.

NCBI Accession No.577295, PN:118

[0125]

(Array number: 36) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 1, or cDNA is shown.

(Array number: 37) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker

polypeptide of the array number 2, or cDNA is shown.

(Array number: 38) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 3, or cDNA is shown.

(Array number: 39) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 4, or cDNA is shown.

(Array number: 40) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 5, or cDNA is shown.

[0126]

(Array number: 41) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 6, or cDNA is shown.

(Array number: 42) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 7, or cDNA is shown.

(Array number: 43) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 8, or cDNA is shown.

(Array number: 44) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 9, or cDNA is shown.

(Array number: 45) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 10, or cDNA is shown.

[0127]

(Array number: 46) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 11, or cDNA is shown.

(Array number: 47) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 12, or cDNA is shown.

(Array number: 48) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 13, or cDNA is shown.

(Array number: 49) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 14, or cDNA is shown.

(Array number: 50) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 15, or cDNA is shown.

(Array number: 51) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 16, or cDNA is shown.

[0128]

(Array number: 52) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 17, or cDNA is shown.

(Array number: 53) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 18, or cDNA is shown.

(Array number: 54) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 19, or cDNA is shown.

(Array number: 55) The nucleotide sequence of mRNA in which the array number 20 carries out a prostatic marker, or cDNA is shown.

(Array number: 56) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 21, or cDNA is shown.

(Array number: 57) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 22, or cDNA is shown.

[0129]

(Array number: 58) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 23, or cDNA is shown.

(Array number: 59) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 24, or cDNA is shown.

(Array number: 60) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 25, or cDNA is shown.

(Array number: 61) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 26, or cDNA is shown.

(Array number: 62) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 27, or cDNA is shown.

[0130]

(Array number: 63) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 28, or cDNA is shown.

(Array number: 64) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 29, or cDNA is shown.

(Array number: 65) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 30, or cDNA is shown.

(Array number: 66) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 31, or cDNA is shown.

(Array number: 67) The nucleotide sequence of mmr which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 32, or cDNA is shown.

(Array number: 68) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 33, or cDNA is shown.

[0131]

(Array number: 69) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 34, or cDNA is shown.

(Array number: 70) The nucleotide sequence of mRNA which encodes the prostatic marker polypeptide of the array number 35, or cDNA is shown.

(Array number: 71) The amino acid sequence of the polypeptide fragment of the prostatic marker polypeptide of the array number 19 is shown.

(Array number: 72) The amino acid sequence of the polypeptide fragment of the prostatic marker polypeptide of the array number 21 is shown.

(Array number: 73) The amino acid sequence of the polypeptide fragment of the prostatic marker polypeptide of the array number 30 is shown.

[0132]

(Reference)

1. Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I. Optimal timing and dosage of chemotherapy as a combined treatment with androgen withdrawal in the human prostate LNCaP tumour model. *Br J Cancer*. 2001; 84:859-63.
2. Oh-Ishi M, Satoh M, Maeda T. *Electrophoresis*. 2000 May; 21(9): 1653-69
3. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995, 16 : 1034-59
4. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 1996, 379 : 466-9
5. Molecular Cloning, 2nd Ed,J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)
6. Uchida T, Gao JP, Wang C et al. *Mol Urol*. 2001 Summer;5(2):71-8

[Brief Description of the Drawings]

[0133]

[Drawing 1]Drawing 1 shows the distribution map of the protein contained in a prostatic cancer obtained by the agarose two dimensional electrophoresis of 6-10% concentration gradient gel with emphasis on a polymers protein region.

[Drawing 2]Drawing 2 shows the distribution map of the protein contained in a prostatic cancer obtained by the agarose two dimensional electrophoresis of 12% concentration uniform gel with emphasis on an inside low molecule protein region.

[Drawing 3]Drawing 3 indicates the fixed-quantity comparison graph to be the protein spot which showed quantitative increase and decrease in an androgen dependence group, and androgen a non-depending group.

[Drawing 4]Drawing 4 is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of Rad50 which is prostatic marker polypeptide.

[Drawing 5]Drawing 5 is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of Mop-4 which is prostatic marker polypeptide.

[Drawing 6]Drawing 6 is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of VDAC-1 which is prostatic marker polypeptide.

[Drawing 7]Drawing 7 is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of LON protease which is prostatic marker polypeptide.

[Drawing 8]EBNA-2 co-activator whose drawing 8 is prostatic marker polypeptide; It is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of p100.

[Drawing 9]Drawing 9 is an image of Scaffold attachment factor B which is prostatic marker polypeptide, and the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of HSP27 ERE-TATA-binding protein.

[Drawing 10]Drawing 10 is an image of the electrophoresis which shows the manifestation in the prostate cancer tissue of Ubiquitin-activating enzyme E1.